

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-501140

第6部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)2月2日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
G 0 1 N 30/48	G	8310-2J	
B 0 1 D 15/08		8014-4D	
G 0 1 N 30/48	M	8310-2J	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願平5-507935	(71) 出願人	コーネル・リサーチ・ファウンデーション・インコーポレーテッド
(86) (22) 出願日	平成4年(1992)10月21日		アメリカ合衆国ニューヨーク州14850イサカ・ソーンウッドドライブ20・スイート105
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)4月15日	(72) 発明者	フレチエツト, ジーン・エム・ジエイ
(86) 国際出願番号	PCT/US92/09100		アメリカ合衆国ニューヨーク州14850イサカ・フエアウエイドライブ25
(87) 国際公開番号	WO93/07945	(72) 発明者	スベク, フランティセク
(87) 国際公開日	平成5年(1993)4月29日		アメリカ合衆国ニューヨーク州14853イサカ・アパートメントデイ25・メイプルアベニュー201
(31) 優先権主張番号	779,929	(74) 代理人	弁理士 小田島 平吉
(32) 優先日	1991年10月21日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(81) 指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE), JP		

(54) 【発明の名称】 マクロ細孔ポリマー媒体が備わっているカラム

(57) 【要約】

マクロ細孔ポリマープラグの形態で分離用媒体を含んでいる連続液体クロマトグラフィーカラムを開示する。このカラムは、ビードまたは粒子が充填されている通常のカラムに比べて数多くの利点を有している。このプラグは、直径が200nm未満の小さい孔と、直径が600nm以上の大きい孔の両方を含んでいる。

請求の範囲

1. 硬質管と、カラム内に配置されておりそしてこのカラムの断面領域を横切って伸びているマクロ細孔有機ポリマーの少なくとも1種の連続プラグを含んでいる連続液体クロマトグラフィーカラムにおいて、このプラグが、約200nm未満の直径を有する小さい孔と、約600nm以上の直径を有する大きな孔を含んでおり、そしてこの大きな孔が、このプラグの全細孔容積の少なくとも約10%を与えているカラム。
2. 該マクロ細孔ポリマープラグが約30から90%の間隙率を有している請求の範囲1のカラム。
3. 該管がマクロ細孔ポリマーの2種以上の異なるプラグを含んでいる請求の範囲1のカラム。
4. 該マクロ細孔ポリマーがポリビニルモノマーのポリマーを含んでいる請求の範囲1のカラム。
5. 該マクロ細孔ポリマーがポリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの共重合体を含んでいる請求の範囲1のカラム。
6. (i) 両末端を閉じた管に、ポロゲンを含んでいる脱気した重合混合物を加え、(ii) この混合物を重合させることでマクロ細孔有機ポリマープラグを生じさせ、そして(iii) このマクロ細孔ポリマープラグを洗浄することでそのポロゲンを除去し、そして200nm未満の直径を有する小さい孔と約600nm以上の直径を有する大きい孔とを含んでいるプラグを生じさせる段階を含む、請求の範囲1のカラムを製造する方法。
7. 該重合混合物を少なくとも2つの部分として加え、これらの部分の各々に関して、次の部分を添加するに先立って重合を実施する請求

の範囲6の方法。

8. 少なくとも2種の異なる重合混合物を連続的に加え、これらの混合物の各々に関して、次の混合物を添加するに先立って重合を実施する請求の範囲6の方法。
9. 該洗浄段階を、該プラグを該管の中に置きながら実施する請求の範囲6の方法。
10. 最初に該管から該プラグを取り出し、このプラグを洗浄した後、このプラグをその管に戻すことによって、該洗浄段階を実施する請求の範囲6の方法。
11. 該プラグを該管に戻した後、このプラグを膨潤させる請求の範囲10の方法。
12. 該重合混合物がポリビニルモノマー、開始剤およびポロゲンを含んでいる請求の範囲6の方法。
13. 該重合混合物が更にモノビニルモノマーを含んでいる請求の範囲12の方法。
14. 該重合混合物が更にポリマーを含んでいる請求の範囲12および13の方法。
15. 該ポリマーが可溶ポリマーである請求の範囲14の方法。
16. 該ポリマーが不溶ポリマー粒子である請求の範囲14の方法。
17. 該ポリマー粒子を、該重合混合物と組み合わせるに先立って、この重合混合物に混和性を示さない液体に浸漬する請求の範囲16の方法。
18. 該不溶ポリマー粒子がマクロ細孔性を示し、そしてこれらを、該重合混合物内に存在しているのと同じモノマーから生じさせる請求の

範囲16の方法。

19. 請求の範囲1から5のカラムを用いることを含む、液体クロマトグラフィーによる化合物の分離方法。
20. 硬質管と、カラム内に配置されておりそしてこのカラムの断面領域を横切って伸びているマクロ細孔有機ポリマーの少なくとも1種の連続プラグを含んでいるカラムにおいて、このプラグが、約200nm未満の直径を有する小さい孔と約600nm以上の直径を有する大きな孔を含んでおり、そして有機溶媒および水から選択される液体を少なくとも約200cm³/時の線形流量および約30MPa(4,500psi)未満の圧力で通過させ得るカラム。
21. 該大きな孔が、該プラグの全細孔容積の少なくとも約10%を与えている請求の範囲20のカラム。
22. 該マクロ細孔ポリマーがポリビニルモノマーのポリマーを含んでいる請求の範囲20のカラム。
23. 該マクロ細孔ポリマーがポリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの共重合体を含んでいる請求の範囲20のカラム。

明 細 書

マクロ細孔ポリマー媒体が備わっているカラム

発明の背景

通常のクロマトグラフィーは、一般に、クロマトグラフィー分離を受けさせるべきサンプルを球形ビードの床に通すことによって実施されている。これらのビードは、通常、これらのビード間の間隙体積を最小限にしてこのカラム効率を増大させるような様式で、管またはカラムの中に充填されている。球形粒子を製造する伝統的な合成ルートは懸濁重合によるものである。この種類の重合におけるモノマー類の選択は、その分散相に溶解性を示さないモノマー類に限定されている。従って、この技術を全てのポリマー類に適用することは不可能である。この技術の実施は容易であるが、得られるビードはむしろ多分散したサイズを有するものである。従って、充填するに適した均一なサイズを有するビードを得るには、一般に、時間のかかるサイズ分別を繰り返して実施する必要がある。その結果として、この様式におけるカラム充填は時間を必要とすると共に高価である。

カラム効率を改良するには小さい粒子またはビードを用いる方が望ましい、と言うのは、このようなビードは一般に間隙体積が小さくなるように充填するのがより容易であるからである。小さい多孔質ビードの合成は、例えば種晶を用いた重合などによって達成され、そしてこのようなビードが、より高い効率を達成する目的でカラム内で用いられてきた。しかしながら、更に小さいビードを用いると、これらのビードが小さくなればなる程必要とされるカラムが短くなることから、問題が生じてきた。カラムが短くなることに関連した特定の問題は解決され得る。短く

した長さを直径を大きくすることによって補正しない限り、そのように短くしたカラムのカラム体積が小さくなってしまふ（これによって分離容量が小さくなる）。分離に関しては、通常、これらのビードが有する孔直径が分離すべき高分子のストック（Stocks）直径の3倍以上である時、最良の結果が達成される。その結果として、これらのビードは非常に高い多孔性を示す必要があり、従って、これらは低い機械強度を示すことから充填するのが益々困難になる。このような技術的限界から、液クロ用カラムの速度および分解能を増大させる目的で粒子サイズを更に小さくする方向は終点に向かっていてと見られる。

現在良好な品質を示すクロマトグラフィー充填物は、約50から60%の間隙率を有している。この細孔容積を増大する方法は知られているが、その得られる高い多孔性を示す充填物が非常に脆くなる傾向を示すことから、それらが示す機械的特性はHPLCで期待されている基準に到達していない。カラム効率を改良する目的で他の通常でないアプローチが試みられてきた。

例えば、Bio Radは、蛋白質をクロマトグラフィー分離する目的で、テフロン（Teflon）（商標）ポリマーウェブ（全体積の10%）の中にステレンージビニルベンゼンのイオン交換樹脂（90%）を含ませた0.4mm厚の軟質盤であるBio-Rex（商標）を製造している。テフロンポリマーを10%用いた場合、これらがビード間に完全に位置している時でさえも、それらの間の間隙空間を完全に占めることは不可能であり、粒子間にいくらかの空隙が残る。これが、このカラムがその理論的最大効率に到達するのを邪魔している。

PCT公開第90/07965には、重力流れ（加圧流れではなく）で用い

して、カラム効率は理想から程遠いものである。

従って、これらのアプローチのいずれも、通常の充填床クロマトグラフィーカラムに関連した問題を完全に解決するものではない。

ヨーロッパ特許第0,231,684号には、適当な位置にキャスト、即ち液クロ装置内に直接にか、或は超臨界液クロ装置内の絞りとして間接的に、単に分離用媒体を適当な位置に維持している多孔質のセラミック、即ち無膜プラグが備わっているクロマトグラフィーカラムが開示されている。このセラミック製プラグは分離用媒体ではない。

従って、本発明の目的の1つは、密に詰まっており本質的に全く間隙体積を有していない、クロマトグラフィーカラムで用いるに適した分離用媒体を製造することにある。

本発明の別の目的は、容易かつ安価に製造可能なクロマトグラフィーカラムを製造することにある。

本発明のさらなる目的は、このカラムの最終使用に適合させる目的でこの分離用媒体を注文に合わせる事が可能なように、多様なモノマー類からポリマー状の、即ち有機の分離用媒体を製造することにある。

さらなる目的は、非常に大きな物、例えば蛋白質凝集物、ミセルまたは核酸などを分離するための分離用媒体となり得る連続床を製造することにある。このような大きな物の特定物は、通常の充填カラムを用いたのでは、その充填された粒子間の間隙空間におけるせん断力による劣化を受けることから分離不可能である。

本発明の上記およびさらなる目的は、本発明の下記の説明から明らかになるであろう。

発明の開示

るに適切なクロマトグラフィーカラム用プラグ（plug）が開示されている。このプラグは、流体力学的流れを可能にするに充分な大きさを有する亀裂とチャンネルが含まれている。このプラグは、アクリル酸とメチレンビスアクリルアミドとの重合混合物を含んでいる。このPCT公開第90/07965出願の2カ月後に出版されたBjerten他、J. Chromatography、473（1989）、273-275には、このPCT公開の中に開示されているプラグは圧力をかけると崩壊することからこれをクロマトグラフィーで用いるのは不可能であると開示されている。この問題を解決する目的で、Bjertenは、このプラグを強力に圧縮してその分解能と共に圧力に耐える能力を増大させることを推奨している。このような圧縮は、本来、このプラグの中に不均一なチャンネルを生じさせるものであり、その結果として、理想的なカラム効率よりも低くするものである。

米国特許第4,889,632号、4,923,610号および4,952,349号（Svec他）には、いわゆる「膜クロマトグラフィー」のための薄層マクロ細孔膜が開示されている。これらの膜はポリマーのマクロ細孔シートから打ち抜かれており、またそれを用いるためのカートリッジはカラムとは異なっており、カラムではない。実際、膜クロマトグラフィーはクロマトグラフィーではない、と言うのは、その分離された分子がその膜を通過する時、繰り返される吸収-脱離段階は全く存在しないからである。

Kumakura他、J. Nat. Sci.、24（1989）、1809-13には多孔質ポリマー複合体カラムが開示されている。このポリマー材料は、-78℃の放射線キャスト重合によりモノマー類の組み合わせから製造されていない。その得られるポリマー材料は、直径が10から40ミクロンに及び極めて大きな穴を含んでおり、サブミクロンの孔ではない。その結果と

従って、本発明は、連続カラム、好適にはクロマトグラフィーカラムを意図したものであり、これは、内部断面領域を横切ってそのカラムの中に配置されている連続したマクロ細孔ポリマー材料から成る少なくとも1種のプラグを含んでいる。この得られるカラムはクロマトグラフィーカラムとして有効性を示すと共に、これはまた、液体を通過させる能力を有していることから、種々の触媒過程、診断過程および吸収過程で利用される。本発明に従うマクロ細孔ポリマー材料は、約0.1mL/g以上、好適には0.5mL/g以上の溶媒回復度（その孔の中に非溶媒性溶媒を収容する能力）を示す。これらの材料は、小さい孔、即ち直径が200nm未満の孔ばかりでなく、大きな孔、即ち直径が少なくとも約600nmの孔も含んでいる。このカラムの内部断面領域を横切って伸びるマクロ細孔媒体のプラグは、少なくとも約5mmの厚さを有している。この厚さによって、このプラグは単なる膜から区別される。このプラグは、好適には、約5から200mmの範囲の厚さ（長さ）を有する長く伸びた棒状材料である。単一プラグを用いるのが現在の所好適であるが、特に複数のプラグが異なる組成または構造を有している場合、多数のプラグを用いることも可能である。従って、多数のカラムを列として用いる代わりに、それらの吸収特性を単一の連続カラム内に工学的に組み込むことも可能である。このように、上方のプラグに、イオン類と対立するイオンクロマトグラフィーに適した抑制特性を与え、そしてその次のプラグに、所望の分離を行わせることも可能である。

このマクロ細孔ポリマープラグは、ポリビニルモノマーか、或はより好適にはポリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの混合物を、開始剤およびポロゲン（porogen）の存在下で重合させることを経由して製

造される。この重合混合物はまたマクロ細孔ポリマー粒子を含んでいてもよい。この重合混合物をそのカラムに加えた後、マクロ細孔ポリマープラグが生じるようにその中で重合を開始させる。次に、この有機ポリマープラグを適切な液体で洗浄することでそのポロゲンを除去する。

本発明の少なくとも1種のマクロ細孔ポリマープラグ分離用媒体が入っているクロマトグラフィーカラムは、従来技術の充填カラム以上の利点を有している。例えば、本発明のカラムは、粒子間体積が存在していないことから密に詰まっている。これにより、非常に高い透過率が得られることで、カラム効率が非常に高くなる。このカラムは、厄介なビードまたは粒子詰め込みが必要でないことから、調整が容易である。むしろ、本発明のカラムは、ポロゲンの存在下で実施される簡単な重合方法を用いて調整される。本発明のカラムが示す別の利点は、この分離用媒体を生じさせる目的で用いるモノマー化学を選択するに多様性を示すことである。このような多様性は、多数の異なるモノマーを用いることが可能であるところの、このマクロ細孔ポリマー方法の柔軟性から生じるものである。

図の簡単な説明

図1は、実施例Vの連続カラムを用いた時の、ニワトリ卵アルブミンのイオン交換クロマトグラムである。

図2は、実施例Vの連続カラムを用いた時の、ニワトリ卵白蛋白質のイオン交換クロマトグラムである。

図3は、実施例Vの連続カラムを用いた時の、モデル蛋白質混合物のイオン交換クロマトグラムである。

図4は、実施例V1で製造したプラグの孔サイズ分布曲線である。

多数のプラグを用いることができる。2個以上のプラグを用いる場合、これらの大きさおよび/または組成は同一か或は異なってもよい。

この得られるプラグは、約200nm未満の小さい孔を含んでいることに加えて、非常に大きな孔も含んでいる。この間隙率の一部は、直径が約600nm以上から約3,000nmに及ぶ大きな孔によって与えられる。好適には、これらの大きな孔は、直径で、約800から2,500nm、より好適には約800から2,000nm、最も好適には約900から2,000nmである。これらの大きな孔は、このプラグの全細孔容積の少なくとも約10%を表している。これらの大きな孔が全細孔容積の約10%未満の場合、その背圧が高くなり過ぎるであろう。好適には、これらの大きな孔は、全細孔容積の少なくとも約20%を表している、と言うのは、孔が大きければ大きい程そこを通る液体にかかる背圧が低くなるからである。これらの大きな孔は、全細孔容積の50%以上を表すことさえできる。小さい孔の大きさは一般に約0.8から200nm、より好適には1から約100nmの範囲である。

この得られるプラグはまた、液クロ装置が通常運転されている圧力、即ち約40MPa (6,000psi) に及ぶ圧力で、このプラグを液クロにおける分離用媒体として利用できる程充分に堅いものである。このプラグは、1種以上の有機溶媒と水を含んでいる液体組成物が、約30MPa (4,500psi) 未満の圧力下で、厚さが150mmのプラグを少なくとも約200cm³/時の線形流量で通過することが可能な如き、均衡の取れた適当なマクロ細孔度と物理的強度を有している。

これらのカラムを製造する方法は、一般に、(1)ポロゲンが入っている脱気した重合可能混合物を、両端を閉じた硬質管の中に入れ、(2)

図5は、実施例V11のプラグによる背圧と流量との関係を示す曲線である。

図6は、実施例V11のプラグに関する、チトクロームC、ミオグロビンおよびニワトリ卵アルブミンの勾配溶離クロマトグラムである。

好適な態様の詳述

より詳細には、本発明のカラムは、好適には筒状であるが長方形または多角形であってもよい、本質的に硬質の管を含んでいる。この管は、金属、ガラスおよび硬質ポリマーを含む、クロマトグラフィーカラムの製造で用いられる通常の材料のいずれかから作られていてもよい。この管は限定された度合で柔軟性を示してもよいが、これは本質的に堅く、その結果として、この重合反応を行っている間、その管の容積変化は本質的に生じない。この管を液クロ用カラムとして用いる場合、この管の各末端を、液クロに連結させるに適した継ぎ手で閉じる。本分野で知られている如何なる通常の継ぎ手も用いられ得る。

この管の中に、マクロ細孔有機ポリマーから成る少なくとも1種のプラグを配置させる。カラム分離用媒体として働くプラグに通すべきサンプルをこのプラグに貫通させる必要があるように、このプラグは、この管の内部断面領域を完全に横切って伸びている。このプラグの厚さは約5mm以上であり、そのことからこれは膜から区別される。これの全体寸法は、勿論、このカラムの大きさに依存している。一般に、このプラグの断面積は、数平方マイクロメートルから数平方メートルの範囲であり(利用できる管の大きさによってのみ制限される)、そしてその厚さ、即ち長さは約5から200mm、もしくはそれ以上である。このマクロ細孔プラグが占めている管の長さを伸ばす目的で、1つのプラグか或は

この混合物を重合させることでマクロ細孔ポリマープラグを生じさせ、そして(3)このプラグ(またはプラグ類)を溶媒で洗浄することにより、その製造したマクロ細孔ポリマー内に存在しているポロゲンを除去する、ことを含んでいる。

この重合混合物は、最小限、少なくとも1種のポリビニルモノマー、フリーラジカルを発生する開始剤、およびポロゲンを含んでいる。この混合物はまた、1種以上のモノビニルモノマー類および/または可溶ポリマー類または不溶マクロ細孔ポリマー粒子を含んでいてもよい。

適切なポリビニルモノマー類には、ジビニルベンゼン、ジビニルナフタレン、ジビニルピリジン、ジメタクリル酸アルキレン類、ジメタクリル酸ヒドロキシアルキレン類、ジアクリル酸ヒドロキシアルキレン類、ジメタクリル酸オリゴエチレングリコール類、ジアクリル酸オリゴエチレングリコール類、ポリカルボン酸のビニルエステル類、ジビニルエーテル、ペンタエリスリトールのジ、トリまたはテトラメタクリレートまたはアクリレート、トリメチロールプロパンのトリメタクリレートまたはアクリレート、アルキレンビスアクリルアミド類またはメタアクリルアミド類、および上記適切なポリビニルモノマー類いずれかの混合物が含まれる。これらのアルキレン基は一般に約1-6個の炭素原子を含んでいる。

用いられ得るモノビニルモノマー類には、スチレン、環置換スチレン類(これらの置換基にはクロロメチルが含まれる)、18個の以下の炭素原子を有するアルキル、ヒドロキシル、1-ブチルオキシカルボニル、ハロゲン、ニトロ、アミノ基、保護されているヒドロキシルまたはアミノ基、ビニルナフタレン、アクリレート類、メタアクリレート類、ビニ

特表平7-501140 (5)

ルアセテート、ビニルピロリドンおよびそれらの混合物が含まれる。このポリビニルモノマーか、或はポリビニルモノマーとモノビニルモノマーは、一般に、この重合混合物の中に約10から60体積%の量、より好適には約20から40体積%の量で存在している。

使用するボロゲンは、種々の異なる種類の材料から選択され得る。例えば、適切な液状ボロゲン類には、脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、エステル類、アルコール類、ケトン類、エーテル類、可溶ポリマー類の溶液およびそれらの混合物が含まれる。このボロゲンは、一般に、この重合混合物の中に約40から90体積%の量、より好適には約60から80体積%の量で存在している。

これらのモノマー類と組み合わせ、可溶ポリマー類および不溶ポリマー粒子を用いることができる。これらのポリマー類は、重合に先立ってその重合混合物の中に添加される。これらの可溶ポリマー類は、プラグに溶媒を通すことによって、そのプラグが生じた後のプラグから溶出して来る。これらの可溶ポリマー類は、最終プラグの間隙率を増大させるポリマー状ボロゲンとして働く。ここで用いるに適切な可溶ポリマー類には、スチレンまたは環置換スチレン、アクリレート類、メタアクリレート類、ジエン類、塩化ビニルおよび酢酸ビニルの如きモノマー類の未架橋ポリマー類または共重合体が含まれる。重合中に体積が収縮するのを低くする目的で、不溶ポリマー粒子を用いる。この重合混合物内のモノマー類の体積が低ければ低い程、重合した時の体積収縮が小さくなる。ここで用いるに適した不溶ポリマー粒子には、同じモノマー類の架橋共重合体であるマクロ細孔ポリマー粒子が含まれる。しかしながら、その重合混合物を生じさせる目的で用いたのと同じモノマー類から生じ

させた不溶ポリマー粒子を用いるのが、適合性の点から現在のところ好適であり、これとそれらを組み合わせる。これらのポリマー粒子は、最初約1から1,000マイクロメートルの直径を有している。このポリマー粒子の混合物は同じ粒子サイズを有している必要はない。実際、不規則な大きさを有するポリマー粒子を用いる方が経済的であり、従って現在のところ好適である。必要ではないが、これらのポリマー粒子を、フリーラジカル重合を禁止する禁止剤が入っているもよい、重合混合物に混和性を示さない液体に浸漬してもよい。これは、孔の詰まりの原因となると共に有効にそれらをその分離過程から取り去るマクロ細孔粒子内部の重合を防止する目的で行うものである。このロッドは、その時、この分離過程に貢献し得ない無孔質ブルを含んでいる。適切な禁止剤には、塩化第二銅および亜硝酸ナトリウムが含まれる。この禁止剤は、全粒子重量を基準にして約0.001から1重量%の量、より好適には約0.1から1重量%の量で存在している。

好適には、この重合混合物で用いるに先立って、これらのポリマー粒子の脱気を行う。これは、本分野で知られている通常の手段のいずれかを用いて達成され得る。しかしながら、任意に重合禁止剤が入っている水の中にこれらの粒子を浸漬した後、約5から20分間の如き適切な期間、水流ポンプ真空下にこの水-ポリマー粒子混合物を維持することによって、その孔から空気を除去するのが現在のところ好適である。次に、過剰水を濾過で除去してもよい。該可溶ポリマー類は、一般にこの重合混合物の約5から40体積%の量で存在しており、そして不溶ポリマー粒子は約5から50体積%の量で存在している。

重合を開始させる目的で、フリーラジカルを発生する通常の重合開始

剤を用いることができる。適切な開始剤の例には、〇〇ーミームイルー〇ー(2-エチルヘキシル)モノパーオキシカーボネート、ジプロピルパーオキシジカーボネートおよびベンゾイルパーオキサイドの如きパーオキサイド類、並びにアゾビスイソブチロニトリル、2,2'-アゾビス(2-アミジプロパン)ジヒドロクロライドおよび2,2'-アゾビス(イソブチルアミド)二水化物などが含まれる。プラグ内の孔分布を調節する手段として開始剤の選択が用いられ得ることが見いだされた。特に、アゾビスイソブチロニトリルを用いて重合を実施する時、その大きな孔は全細孔容積の50%以上であるが、それをベンゾイルパーオキサイドに置き換えると、その大きい孔の容積は全細孔容積の20%にまで低下した。この開始剤は、一般に、該モノマーの約0.2から5重量%の量でその重合混合物内に存在している。

この重合混合物をその管に入れるに先立って、この混合物の中に存在している酸素を除去するに充分な期間、窒素の如き不活性ガスをこの混合物の中にバブリングするなどの如き通常的手段で、この混合物の脱気を行う。この重合混合物を調整して脱気を行った後、これを、適切な継ぎ手で両末端を閉じた管の中に入れる。この重合混合物の全部を加えた後、重合させて単一プラグを生じさせる。別法として、この重合混合物を分割して加えてもよく、各添加後から次の添加を行うまで重合を行う。連続した添加で同じモノマー混合物を用いると、単一プラグカラムが得られる。2種以上の異なる重合混合物を連続して用いると、この方法では、2種以上の異なるプラグが生じる。現在のところ好適なものは単一プラグカラムである、と言うのは、これは現在通常の充填カラムによりよく適合しているからである。多数プラグ技術を通常の装置に適用する

のは困難であり、この技術は、1つの単一カラム内に異なる分離用媒体を特別に組み合わせることの利点を採用する新規なクロマトグラフィー様式と一緒に最良に用いられる。次に、重合を行う準備としてこの管を密封する。

この混合物をその管の中に入れた後、用いる開始剤とモノマー類に応じて、約6から24時間、一般に約50から90℃の温度の通常様式で重合を実施する。この重合は、好適には窒素またはアルゴンなどの不活性雰囲気内で実施される。本分野で知られている何らかの手段を用いて熱をかけることも可能であるが、この重合混合物が入っている密封した管を、加熱した浴の中に浸漬するのが現在のところ好適である。重合中に生じる収縮はその孔構造全体に影響を与えるが、この硬質管の壁との接触は維持される。

重合が完了した後、この固体状のマクロ細孔ポリマープラグを洗浄することで如何なるボロゲン溶媒も除去し、そして適切な溶媒を用いて、存在している如何なる可溶ポリマーも溶解させる。適切な洗浄溶媒には、メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン、アセトン、テトラヒドロフランおよびジオキサンが含まれる。この洗浄過程は段階的に行われてもよく、例えば、溶媒に続いて水で洗浄した後、再び溶媒で洗浄するか、或は溶媒を用いて連続洗浄することによって行われてもよい。この洗浄段階は、好適には、そのマクロ細孔ポリマーが詰まっている管を通してその溶媒をポンプ輸送することによって実施される。

特定の場合として、特にこのカラムの次の使用にとってこのマクロ細孔ポリマーに特定の官能基を加えるのが有利である場合、特定の官能基を加えるに適切な材料でこのポリマーを処理することができる。例えば、

このマクロ細孔ポリマーが重合させたメタクリル酸グリシジルを含んでいる場合、このポリマーとジエチルアミンの如きアミンとを反応させるとN、N-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロピル(DEAHP)基が生じ、或は塩酸トリエチルアミンと反応させると第四級トリメチルアミノ(Q)基が生じ、また、このポリマーが有するエポキシ基の加水分解を最初に生じさせた後クロロ酢酸と反応させるとカルボキシメチル(CM)基が生じ、或は発煙硫酸-1, 4-ジオキサン複合体と反応させるとスルホン酸(SP)基が生じ得る。これらの基は、イオン交換クロマトグラフィー使用蛋白質分離に必須である。アルコラート類、例えばカリウムブチラート、オクチラートおよびヘキサデシラートなどと反応させることにより、このマクロ細孔ポリマーに疎水基を与えることができる。この組の基は、疎水相互作用における分離および逆相様式に必須である。また、このポリマーを、単一化合物または小さい群の化合物に特異的な親和剤(affinants)と反応させて、これをアフィニティークロマトグラフィーで用いることができる。適切な親和剤は抗体、抗原、染料、糖類、レクチン類、蛋白質および核酸である。同様な様式で、また、他のモノマー類を基とするポリマー類を修飾して、全ての様式のクロマトグラフィーで用いることができる。その後、このプラグを適切な溶媒で段階的にか或は1段階操作で洗浄してもよい。

この洗浄段階に関係した更に別の代替方法は、その重合したプラグをその管から取り出し、適切な溶媒でそれを洗浄した後、これをその管に戻すことを伴っている。この戻したポリマーをそのままにしておくか、或はテトラヒドロフラン、1, 4-ジオキサン、トルエンまたはハロゲン化炭化水素の如き膨潤用溶媒でそのポリマーを洗浄してその膨潤を

生じさせることにより、その管の中のより広い空間を占めさせるようにすることができる。

この洗浄段階の後、そのマクロ細孔ポリマーが入っている管は使用準備が出来ている。これは、本分野で知られている通常の技術に従い、連続クロマトグラフィーカラムとして用いられると共に、触媒、診断または吸収方法の目的で用いられ得る。例えば、この管をクロマトグラフィーカラムとして用いてサンプルをその成分に分離する場合、このサンプルのための担体として水または緩衝液を用いることができる。このサンプルが入っている溶液をポンプ輸送することにより、それを、その管の中に入っているプラグに遇す。溶媒剤の特性、例えばpH、イオン強度、有機溶媒含有量などを変化させることにより、分離を進行させる。この組成の勾配は、線形、段階様または対数の如き如何なる形態であってもよい。次に、その分離されたサンプルの検出は、本分野で知られている手段を用い、染色技術を用いてそのカラムそれ自身の中か、或はこのカラムからその成分が個々に溶離して来る時、このプラグの下流またはこの管の外側で達成され得る。本発明に従うマクロ細孔ポリマー分離用媒体は、約100から100万の範囲の分子量を有する材料の分離に有効性を示す。充填カラムを用いて行われ得る如何なる分離も本発明のカラムを用いて実施され得る。

以下に示す非制限的実施例を参照して本発明をここに記述するが、全ての部およびパーセントは、特に明記されていない限り重量である。

実施例I

液クロに取り付けるに適した継ぎ手が両末端に備わっているステンレス鋼製管(内部直径が4.6mmであり、長さが50mm)の1つの末

端を、鋼製ナットストッパーで閉じ、この管を窒素バージした後、そのもう一方の末端を、シリコンゴム隔壁で閉じた。4.8gのメタクリル酸グリシジル、3.2gのジメタクリル酸エチレン、10.8gのシクロヘキサノール、1.2gのドデカノール、および0.08gのアゾビスイソブチロニトリルを混合することによって、重合混合物を調製した。この混合物に窒素を20分間バブリングすることによって、存在している如何なる酸素も除去した。この混合物の0.1mLを、その隔壁を通してその管の中に注入した後、熱電対で70℃にしたオイルバスの中で加熱することにより、重合を開始させた。7時間後、その管をその浴から取り出し、放置して室温にまで冷却した後、その隔壁を取り外した。この時点で、このカラムは、長さが5mmの固体状マクロ細孔ポリマープラグを含んでいた。このポリマーをメタノールで洗浄した後、この管の両末端をクロマトグラフィー用ナットで閉じ、そしてこのカラムをHPLCクロマトグラフに取り付けた。最初に、メタノールを異なる流量でそのカラムにポンプ輸送した。その背圧は、0.5mL/分の流量の時0.4MPaであり、流量が1mL/分の時0.8MPaであり、そして2mL/分の時1.6MPaであった。次に、この溶媒をテトラヒドロフランに変えた後の背圧は、0.2mL/分の時0.2MPaであり、そして2mL/分の時1.9MPaであった。この流量に対する背圧の依存性は線形であることが見いだされた。

これらの測定の後、このカラムの底を開けて、溶媒圧を用いてその多孔質ポリマーロッドを取り出した。

実施例II

該重合ストック溶液を0.15mL用いる以外は実施例Iと同様な操

作を用いた。この管から取り出した後のプラグの長さは9mmであった。

このプラグを50mLの丸底フラスコの中に入れた後、ジエチルアミンを5mL加えた。この内容物を3時間還流させた。その重合させたメタクリル酸グリシジル単位のエポキシ基がそのアミンと反応することによってN、N-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロピル基(DEAHP)が生じ、これらの基は、イオン交換クロマトグラフィー使用蛋白質分離にとって必須である。この反応が終了した後、このロッドをメタノール、水、再びメタノールで洗浄した後、乾燥させる。このDEAHP基含有量は1.59ミリモル/gであることが確認された。

この乾燥させたプラグをそのカラム管に戻し、水の中に2時間浸漬し、その末端を継ぎ手で閉じた後、1つの末端をHPLCクロマトグラフのポンプに連結する一方、もう1つを検出器に連結しないままにしておいた。このような構造配置でその背圧を測定した。流量が1mL/分の時の背圧は0.5MPaであり、3mL/分の時のそれは1.3MPaであり、そして5mL/分の時のそれは2.2MPaであった。UV検出器に連結した後の背圧は、0.5mL/分の流量の時0.4MPaにまで上昇した。

このカラムを、そのベースラインのずれが生じなくなるまで(20分間)、0.02モル/Lのトリス-HCl緩衝溶液(pH=7.3)(緩衝液A)を0.5mL/分の流量で用い、クロマトグラフィー条件下で洗浄した。0.21gのチトクロームC、リソチーム、ミオグロビンおよびオボアルブミンが入っている溶液を、ループを通して注入した後、上記ポリマーの連続床が吸収するままにした。このカラムを通した上記緩衝溶液のポンプ輸送を20分間行った後でも、漏れの兆候は全く見ら

れなかった。その吸収は全体的であった。次に、勾配溶離を開始した。この溶離剤を緩衝液Aから緩衝液B（緩衝液Aの中に1モル/Lの塩化ナトリウム）に、10分以内に直線的に変化させた。この予備試験で用いたクロマトグラフィー条件は理想的な条件から程遠いが、4種の蛋白質全ての分離が観察された。これらの蛋白質の保持時間は7.4、7.7、7.9および8.1分であった。

実施例III

実施例Iで用いたのと同じ管の中に、3mLのステレン、1.2mLのジビニルベンゼン（85%のDVB）、6mLのベンジルアルコールおよび0.05gのベンゾイルパーオキサイドから成るストック混合物を0.3mL注入した。脱気した後、この管を閉じ、そして重合を70℃で24時間進行させた。銅製ブランジャーを用い、長さが18mmの多孔質ポリマープラグをその管から押し出した後、メタノールをいくつかに分け、その中で4日間洗浄した。この洗浄後でもこのプラグは元の管に合致していた。この溶媒をテトラヒドロフランに変え、これはそのプラグの膨潤を生じさせた。約20分後、このプラグの直径は、その管の直径以上になった。次の溶媒交換でメタノールを用いて、このプラグを元の大きさにまで収縮させた。その後、このプラグをそのカラムに戻し、そして再びメタノールをテトラヒドロフランに交換した。このカラム内における膨潤を背圧の変化として監視し、この背圧は、この管の残りの部分がまだメタノールで満たされている時の0.3MPaから始まって、この溶媒のいくらかが交換された後の10MPa以上にまで上昇した。その時点で、この装置に関する何らかの可能な損傷が生じるのを防止する目的で、この測定を終了した。

ニトリルを混合することによって、重合混合物を調製した。この混合物を水流ポンプ減圧下で15分間音波処理した後、更に15分間窒素をバブリングすることによって、溶解している気体を除去した。このカラムの管を、上記重合混合物で完全に満たした後、この管を密封した。この重合を70℃の水浴内で8時間進行させた。この重合が完了した後、このカラムをその浴から取り出し、そして周囲温度にまで冷却させた。長さが50mmであるそのロッドを洗浄する目的で、このカラムの両末端に在るストッパーをクロマトグラフィー用継ぎ手に交換した後、このカラムをHPLCクロマトグラフに取り付けた。最初に、メタノールを異なる流量でそのカラムにポンプ輸送することでこのロッドの洗浄を行うと同時に、このカラムを通る流れを試験した。この背圧は、0.5mL/分の流量の時0.8MPaであり、1mL/分の時1.9MPaであり、2mL/分の時4MPaであり、そして5mL/分の時13MPaであった。この背圧は、この洗浄操作全体を通して変化しなかった。このカラムを通してポンプ輸送したメタノールの全量は200mLであった。

このカラムをそのクロマトグラフから取り外した後、このカラムの入りに1mLのジエチルアミンを注入した。このカラムの入りと出口を、デルリン（delrin）プラグで閉じた後、このカラムを、熱電対で60℃にした水浴の中に3時間入れた。次に、このカラムをHPLCクロマトグラフに取り付けた後、その未反応のアミンをメタノールで洗浄除去した。この改質過程中、このプラグは膨潤し、そしてこの膨潤したポリマーが部分的にその孔を占める。これは、この洗浄過程を開始した時の背圧が高いことで説明される。この背圧は、流量が2mL/分の時3

実施例IV

窒素を10分間バブリングすることによって、実施例Iに記述したモノマー類の混合物を脱気した。マクロ細孔ポリ[メタアクリル酸グリシジル-コ-ジメタアクリル酸エチレン]ビードを蒸留水に浸漬した後、この水-ポリマー混合物を水流ポンプ真空下に10分間置くことによって、それらが有する孔から空気を除去した。次に、これらのビードを濾過して過剰水を除去した。次に、これらのビードの約1mLを、連続的に窒素バージしている丸底ガラスビンの中に仕込み、上記脱気した重合混合物を0.5mL加え、この分散液をガラス棒で攪拌した後、このビンを密封した。その重合を70℃で6時間進行させた。この重合が終了した後、このビンの内容物は均一であるように見えた。そのメタアクリル酸グリシジルが有するエポキシ基とそのガラス表面が有するシラノール基とが反応することから、このビンの損傷を生じさせることなくこのビンからそのブロックを取り出すのは不可能であった。そのようにしても、そのブロック表面からそのガラスを剥離させるのは非常に大変であった。このブロックは、小さい片に割れる傾向を示さないか、或はその元のビードとそれに連結している共重合体とのフラグメントは分離する傾向を示さなかった。

実施例V

ステンレス鋼製カラム（内部直径が8mmであり、長さが50mm）の1つの末端を密封し、アルゴンでバージ洗浄した後、そのもう一方の末端をシリコンゴム隔壁で閉じた。36mLのメタアクリル酸グリシジル、24mLのジメタアクリル酸エチレン、72mLのシクロヘキサノール、18mLのドデカノール、および0.6gのアゾビスイソブチロ

2MPaであり、そして1mL/分の時15MPaであった。メタノールを用いて50分間洗浄した後、水-メタノールの1:1混合物を用いた。この背圧は、0.5mL/分の流量の時20MPaにまで上昇した。更に1時間後、このメタノール-水混合物を蒸留水に交換した。この背圧は、流量が0.5mL/分の時の6.6MPa、そして1mL/分の時の12.7MPaにまで低下した。最後に、このカラムを0.02モル/Lのトリス-HCl緩衝液（pH=7.6）（緩衝液A）で洗浄した。流量が0.5mL/分の時の背圧は5.7MPaであった。

ニワトリ卵アルブミン（8mg/mL）、ニワトリ卵白蛋白質（16mg/mL）およびモデル蛋白質混合物（16mg/mL）が入っている溶液（21L）を、ループを通して注入した後、緩衝液Aの流れの中で、その連続マクロ細孔ポリマープラグの上に10分間吸着させるままにした。緩衝液B（緩衝液Aの中に1モル/LのNaCl）の濃度勾配を用い、0.5mL/分の流量で上記蛋白質の溶離を行った。図1-3に示す鋸歯状のクロマトグラムは、それぞれアルブミン（図1）、卵白蛋白質（図2）およびモデル蛋白質（図3）に関するものである。218nmの波長でこれらの検出を行った。勾配クロマトグラフィーに通常の如く、用いた溶媒組成物の勾配から、図1-3のベースラインは平らでない。これらの図内の実線はクロマトグラムであり、そして溶媒組成物の変化を示す目的で、点線を加えた。

実施例VI

直径が8mmであり長さが50mmのステンレス鋼製管の1つの末端をシリコンゴム隔壁で閉じ、そしてもう1つの末端を固体状シリコンゴムプラグで閉じた。3mLのステレン、2mLのジビニルベンゼン、7

5 mL のドデカノールおよび 0.5 g のアソビスイソブチロニトリルを混合することによって、重合混合物を調製した。窒素を 15 分間バージすることによって、この混合物の脱気を行った。この混合物を、その隔壁を通してその鋼製管の中に注入した後、熱電対で 70℃ にした空気浴内でその管を加熱することにより、重合を開始させた。20 時間後、この管をその熱風から取り出し、そして周囲温度にまでゆっくりと冷却した。このカラムの両末端にあるストッパーを取り外して、標準的なクロマトグラフィーカラム継ぎ手に取り換えた。このカラムをクロマトグラフに取り付けた後、メタノールを用い、0.1 mL/分の流量で 1 時間、そして 1 mL/分の流量で 30 分間洗浄した。この 2 番目の洗浄操作中の背圧は一定して 0.2 MPa であった。

このカラムの出口を開け、そして 20 mL/分の流量でメタノールを用い、このカラムからその重合したロッドを押し出した。このロッドを室温で乾燥し、粉砕して小さい片にした後、水銀ポロシメトリー (porosimetry) を用いて、このポリマーの孔サイズ分布を評価した。この分布曲線を図 4 に示すが、これは明らかに、200 nm 未満の小さい孔と 1,000 nm の大きな孔の両方が存在していることを示している。

実施例 V I I

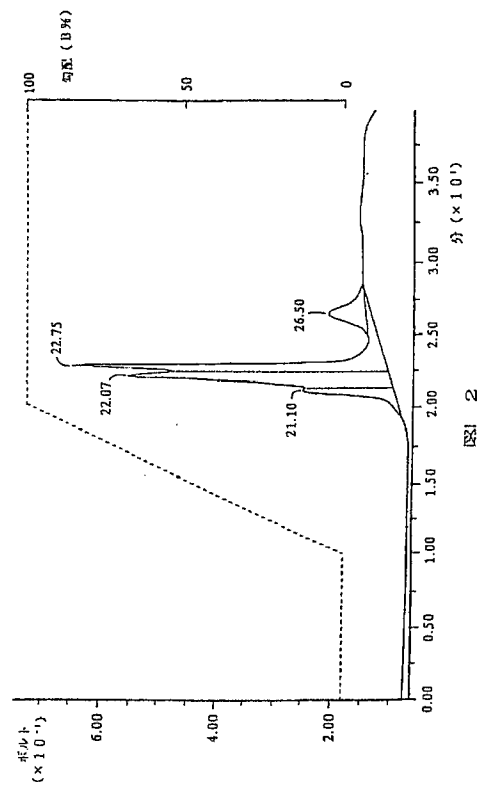
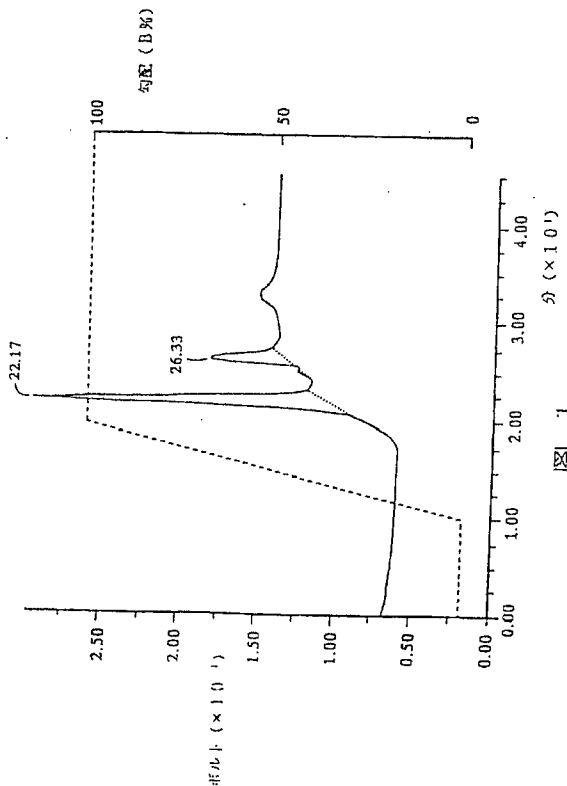
メタノールを用いた洗浄操作が完了した後、このカラムの出口継ぎ手を UV 検出器に連結する以外は、実施例 V I の操作に従ってカラムを調製した。このカラムを、アセトニトリル-水の 1:1 の混合物を用い、1 mL/分の流量で 2 時間平衡にした。次に、この平衡を連続した数段階で 25 mL/分の流量にまで上昇させ、そしてその背圧を記録した。その結果を図 5 に示すが、ここでは、その流量に対する背圧の線形依存

が明らかである。この結果は、クロマトグラフィーで用いるに妥当な背圧、即ち約 40 MPa (6,000 psi) 以下の範囲のまま、非常に高い流量でこの連続ロッドカラムが有効であることを立証している。

チトクローム C、ミオグロビンおよびニワトリ卵アルブミンが入っている溶液をこのカラムに注入した後、勾配溶離クロマトグラフィーを開始させた。水中 20% のアセトニトリルから水中 60% のアセトニトリルへの線形勾配を用いた。このアセトニトリル濃度をその開始濃度から最終混合物に変化させる時間 (勾配時間) は、5 mL/分の流量で 4 分、10 mL/分で 2 分、15 mL/分で 1.3 分、そして 25 mL/分で 0.8 分であった。このクロマトグラムを図 6 に示す。

比較実施例 A

そのステンレス鋼製管を軟質のポリ (テトラフルオロエチレン) 管に置き換える以外は実施例 1 の操作を繰り返す。そのポリマープラグが備わっているその得られる管を通常のクロマトグラフに連結した場合、40 MPa (6,000 psi) の如き高い圧力でも、このプラグを通るテトラヒドロフランの流れは本質的に全く観察されなかった。実施例 6 と同様に、この管を切り離してそのプラグを取り出すことによってこのプラグの孔サイズ分布を評価した時、約 200 nm 以上の孔は全く見だされなかった。



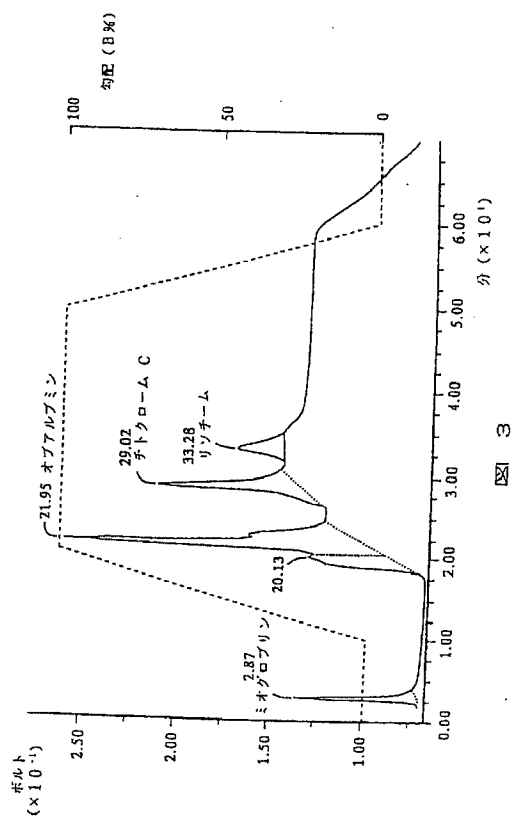


図 3

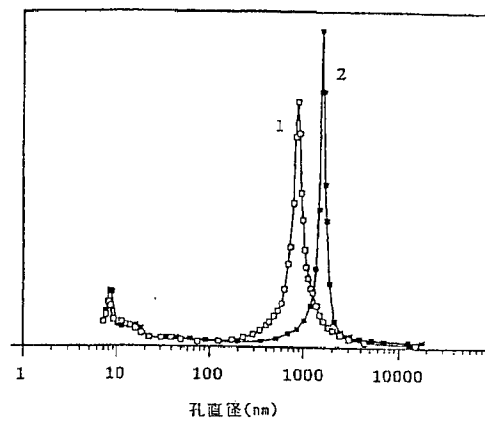


図 4

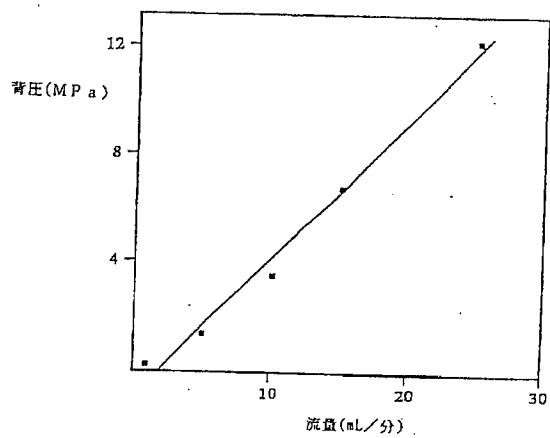


図 5

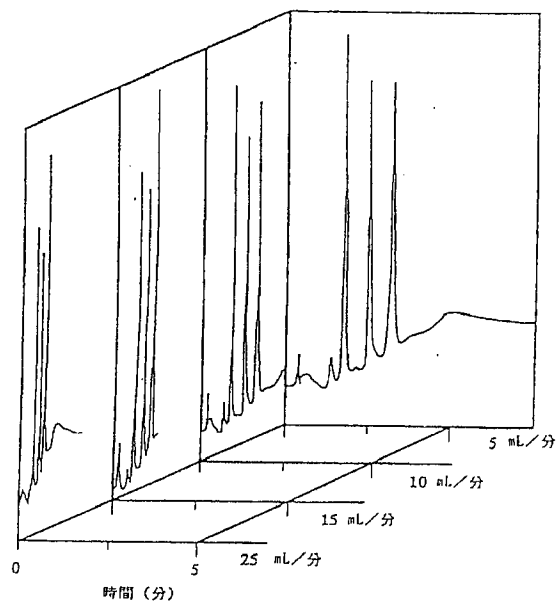


図 6

平成6年4月15日

マクロ細孔ポリマー媒体が備わっているクロマトグラフィーカラム

特許庁長官 麻 生 渡 殿

1. 特許出願の表示

PCT/US92/09100

2. 発 明 の 名 称

マクロ細孔ポリマー媒体が備わっているカラム

3. 特 許 出 願 人

住 所 アメリカ合衆国ニューヨーク州14850イサカ・
ソーンウッドドライブ20・スイート105名 称 コーネル・リサーチ・ファウンデーション・インコ
ーポレーテッド

4. 代 理 人 〒107

住 所 東京都港区赤坂1丁目9番15号

日本自転車会館

氏 名 (6078)弁理士 小田島 平吉

電 話 3585-2256



5. 補正書の提出年月日

1994年1月13日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し(翻訳文)

1 通



た。カラムが短くなることに関連した特定の問題は解決され得る。短くした長さを直径を大きくすることによって補正しない限り、そのように短くしたカラムのカラム体積が小さくなってしまふ(これによって分離容量が小さくなる)。分離に関しては、通常、これらのビードが有する孔直径が分離すべき高分子のストック(Stocks)直径の3倍以上である時、最良の結果が達成される。その結果として、これらのビードは非常に高い多孔性を示す必要があり、従って、これらは低い機械強度を示すことから充填するのが益々困難になる。このような技術的限界から、液クロ用カラムの速度および分解能を増大させる目的で粒子サイズを更に小さくする方向は終点に向かって見られる。

現在良好な品質を示すクロマトグラフィー充填物は、約50から60%の間隙率を有している。この細孔容積を増大する方法は知られているが、その得られる高い多孔性を示す充填物が非常に脆くなる傾向を示すことから、それらが示す機械的特性はHPLCで期待されている基準に到達していない。カラム効率を改良する目的で他の通常でないアプローチが試みられてきた。

例えば、Bio Radは、蛋白質をクロマトグラフィー分離する目的で、テフロン(Teflon)(商標)ポリマーウェブ(全体積の10%)の中にステレン-ジビニルベンゼンのイオン交換樹脂(90%)を含ませた0.4mm厚の軟質盤であるBio-Rex(商標)を製造している。テフロンポリマーを10%用いた場合、これらがビード間に完全に位置している時でさえも、それらの間の空隙空間を完全に占めることは不可能であり、粒子間にいくらかの空隙が残る。これが、このカラムがその理論的最大効率に到達するのを邪魔している。

発明の背景

通常のクロマトグラフィーは、一般に、クロマトグラフィー分離を受けさせるべきサンプルを球形ビードの床に通すことによって実施されている。これらのビードは、通常、これらのビード間の空隙体積を最小限にしてこのカラム効率を増大させるような様式で、管またはカラムの中に充填されている。球形粒子を製造する伝統的な合成ルートは墨濁重合によるものである。この種類の重合におけるモノマー類の選択は、その分散相に溶解性を示さないモノマー類に限定されている。従って、この技術を全てのポリマー類に適用することは不可能である。この技術の実施は容易であるが、得られるビードはむしろ多分散したサイズを有するものである。従って、充填するに適した均一なサイズを有するビードを得るには、一般に、時間のかかるサイズ分別を繰り返して実施する必要がある。その結果として、この様式におけるカラム充填は時間を必要とすると共に高価である。

カラム効率を改良するには小さい粒子またはビードを用いる方が望ましい、と言うのは、このようなビードは一般に空隙体積が小さくなるように充填するのがより容易であるからである。小さい多孔質ビードの合成は、例えば複晶を用いた重合などによって達成され、そしてこのようなビードが、より高い効率を達成する目的でカラム内で用いられてきた。しかしながら、更に小さいビードを用いると、これらのビードが小さくなればなる程必要とされるカラムが短くなることから、問題が生じてき

PCT公開第90/07965には、重力流れ(加圧流れではなく)で用いるに適切なクロマトグラフィーカラム用プラグ(plug)が開示されている。このプラグは、流体力学的流れを可能にするに充分な大きさを有する亀裂とチャンネルが含まれている。このプラグは、アクリル酸とメチレンビスアクリルアミドとの重合混合物を含んでいる。このPCT公開第90/07965出願の2カ月後に出版されたHjerten他、J. Chromatography, 473(1989)、273-275には、このPCT公開の中に開示されているプラグは圧力をかけると崩壊することからこれをクロマトグラフィーで用いるのは不可能であると開示されている。この問題を解決する目的で、Hjertenは、このプラグを強力に圧縮してその分解能と共に圧力に耐える能力を増大させることを推奨している。このような圧縮は、本来、このプラグの中に不均一なチャンネルを生じさせるものであり、その結果として、理想的なカラム効率よりも低くするものである。

米国特許第4,889,632号、4,923,610号および4,952,349号(Svec他)には、いわゆる「膜クロマトグラフィー」のための薄層マクロ細孔膜が開示されている。これらの膜はポリマーのマクロ細孔シートから打ち抜かれており、またそれを用いるためのカートリッジはカラムとは異なっており、カラムではない。実際、膜クロマトグラフィーはクロマトグラフィーではない、と言うのは、その分離された分子がその膜を通過する時、繰り返される吸収-脱離段階は全く存在しないからである。

Kumakura他、J. Mat. Sci., 24(1989)、1809-13には多孔質ポリマー複合体カラムが開示されている。このポリマー材料は、-78℃の放射線キャスト重合によりモノマー類の組み合わせから製造されている。その得られるポリマー材料は、直径が10から40ミクロンに及ぶ

極めて大きな穴を含んでおり、サブミクロンの孔ではない。その結果として、カラム効率は理想から程遠いものである。

従って、これらのアプローチのいずれも、通常の充填床クロマトグラフィーカラムに関連した問題を完全に解決するものではない。

ヨーロッパ特許第0,231,684号には、適当な位置にキャスト、即ち液クロ装置内に直接にか、或は超臨界液クロ装置内の絞りとして間接的に、単に分離用媒体を適当な位置に維持している多孔質のセラミック、即ち無機プラグが備わっているクロマトグラフィーカラムが開示されている。このセラミック製プラグは分離用媒体ではない。

米国特許第5,019,270号には、溶質、特に生物学的材料産物の高分解能および高生産分離を可能にするとして主張されている薄流クロマトグラフィー方法およびマトリックス構造が開示されている。この方法は、特別に設計されたクロマトグラフィーマトリックスに流体を高流量で通すことを伴うものである。これらのマトリックスは、相互連結している1番目と2番目の組の孔を限定していると共に、2番目の組の孔の一員との流体連絡における溶質相互作用のための高い表面積を限定している。この1番目と2番目の組の孔は、粒子間の割れ目およびこれらの粒子内の通し孔(throughpores)として具体化されている。これらの孔は、達成され得る高い流体流量において、両方の組の孔の中に対流流れが生じそしてこの対流流量がその2番目の組の孔内の溶質拡散率を越えるような寸法を有している。このアプローチは、活性を示す表面からそれへの対流と拡散の物質移動を対にすることで、通常に予測されるバンドスプレッド(bandspredding)を生じさせることなく流速の増大を可能にするものである。

を有しておりそしてこれらの大きな孔がその全細孔容積の10%以上、好適には少なくとも20%以上を与えている分離用媒体をインサイチューで成功裏に生じさせるものではなかった。従って、本発明の目的の1つは、密に詰まっており本質的に全く間隙体積を有していない、クロマトグラフィーカラムで用いるに適した分離用媒体を製造することにある。本発明の別の目的は、容易かつ安価に製造可能なクロマトグラフィーカラムを製造することにある。

本発明のさらなる目的は、このカラムの最終使用に適合させる目的でこの分離用媒体を注文に合わせる事が可能なように、多様なモノマー類からポリマー状の、即ち有機的分離用媒体を製造することにある。

さらなる目的は、非常に大きな物、例えば蛋白質凝集物、ミセルまたは核酸などを分離するための分離用媒体となり得る連続床を製造することにある。このような大きな物の特定物は、通常の充填カラムを用いたのでは、その充填された粒子間の間隙空間におけるせん断力による劣化を受けることから分離不可能である。

本発明の上記およびさらなる目的は、本発明の下記の説明から明らかになるであろう。

発明の開示

従って、本発明は、液体クロマトグラフィーに適切な連続カラムを意図したものであり、これは、内部断面領域を横切ってそのカラムの中に配置されている連続したマクロ細孔ポリマー材料の少なくとも1種のプラグカラムをその中に含んでいる。この得られるカラムはクロマトグラフィーカラムとして有効性を示すと共に、これはまた、液体を通過させる能力を有していることから、種々の触媒過程、診断過程および吸収過

英国特許第1,188,736号には、親水性マクロ細孔共重合体のインサイチュー製造が開示されている。エチレングリコールのビスメタクリレート、エチレングリコールのモノメタクリレート、フリーラジカル開始剤、およびベンゼンまたはトルエンから成る混合物を、管か或は成形した構造物の内側で重合させている。重合後、このベンゼンまたはトルエンを除去し、そしてこの漏れを示さない吸収カラムまたは同様な装置は、極性および非極性化合物を製造する目的およびガス分析における極性化合物用検出器を製造する目的で用いられ得る。この共重合体はまた、ガス-液クロにおける固定液相のための基質として、触媒用不活性基質として、並びに吸収および/または透過材料として用いられ得る。

クロマトグラフィー分離用媒体をインサイチューで製造する試みには米国特許第3,541,007号、3,580,843号および3,878,092号が含まれる。米国特許第3,541,007号には網状の連続気泡フォームが開示されており、ここでの最小孔は単に0.05mmであり、そして好適には、このフォームを使用する目的でカラムの中に入れるに先立って、これを粉砕して粒子を生じさせている。米国特許第3,580,843号には連続気泡ポリウレタン構造物が開示されており、これは、ガスクロ分離用媒体として有効であるが、これを液クロで用いるには、このカラムに液体を通すに必要とされる圧力が極めて高いことを鑑み、それで用いるには充分な大きさの孔が備わっていない。米国特許第3,878,092号には、分配剤を用いて分離用媒体をクロマトグラフィーカラムの壁に化学的に結合させることが開示されている。

この従来技術のいずれも、液体クロマトグラフィーで有効な分離用媒体、即ち200nm未満の小さい孔と600nm以上の大きな孔の両方

で利用され得る。本発明に従うマクロ細孔ポリマー材料は、約0.1mL/g以上、好適には0.5mL/g以上の溶媒回復度(その孔の中に非溶媒性溶媒を収容する能力)を示す。これらの材料は、小さい孔、即ち直径が200nm未満の孔ばかりでなく、大きな孔、即ち直径が少なくとも約600nmの孔も含んでいる。このカラムの内部断面領域を横切って伸びるマクロ細孔媒体のプラグカラムは、少なくとも約5mmの厚さを有している。この厚さによって、このプラグは単なる膜から区別される。このプラグは、好適には、約5から200mmの範囲の長さ(長さ)を有する長く伸びた棒状材料である。単一プラグを用いるのが現在の所好適であるが、特に複数のプラグカラムが異なる組成または構造を有している場合、多数のプラグカラムを用いることも可能である。従って、多数のカラムを列として用いる代わりに、それらの吸収特性を単一の連続カラム内に工学的に組み込むことも可能である。このように、上方のプラグカラムに、イオン類と対立するイオンクロマトグラフィーに適した抑制特性を与え、そしてその次のプラグカラムに、所望の分離を行わせることも可能である。

このマクロ細孔ポリマープラグカラムは、ポリビニルモノマーか、或はより好適にはポリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの混合物を、開始剤およびポロゲン(porogen)の存在下で重合させることを経由して製造される。この重合混合物はまたマクロ細孔ポリマー粒子を含んでいてもよい。この重合混合物をそのカラムに加えた後、マクロ細孔ポリマープラグカラムが生じるようにその中で重合を開始させる。次に、この有機ポリマープラグカラムを適切な液体で洗浄することでそのポロゲンを除去する。

本発明の少なくとも1種のマクロ細孔ポリマープラグカラム分離用媒体を含んでいるクロマトグラフィーカラムは、従来技術の充填カラム以上の利点を有している。例えば、本発明のカラムは、粒子間体積が存在していないことから密に詰まっている。これにより、非常に高い透過率が得られることで、カラム効率が非常に高くなる。このカラムは、厄介なビードまたは粒子詰め込みが必要でないことから、調整が容易である。むしろ、本発明のカラムは、ボロゲンの存在下で実施される簡単な重合方法を用いて調整される。本発明のカラムが示す別の利点は、この分離用媒体を生じさせる目的で用いるモノマー化学を選択するに多様性を示すことである。このような多様性は、多数の異なるモノマーを用いることが可能であるところの、このマクロ細孔ポリマー方法の柔軟性から生じるものである。

図の簡単な説明

図1は、実施例Vの連続カラムを用いた時の、ニワトリ卵アルブミンのイオン交換クロマトグラムである。

図2は、実施例Vの連続カラムを用いた時の、ニワトリ卵白蛋白質のイオン交換クロマトグラムである。

図3は、実施例Vの連続カラムを用いた時の、モデル蛋白質混合物のイオン交換クロマトグラムである。

図4は、実施例VIで製造したプラグカラムの孔サイズ分布曲線である。

図5は、実施例VIIのプラグカラムによる背圧と流量との関係を示す曲線である。

図6は、実施例VIIのプラグカラムに関する、チトクロームC、ミ

の大きさおよび/または組成は同一か或は異なってもよい。

この得られるプラグカラムは、約200nm未満の小さい孔を含んでいるに加えて、非常に大きな孔も含んでいる。この間隙率の一部は、直径が約600nm以上から約3,000nmに及ぶ大きな孔によって与えられる。好適には、これらの大きな孔は、直径で、約800から2,500nm、より好適には約800から2,000nm、最も好適には約900から2,000nmである。これらの大きな孔は、このプラグカラムの全細孔容積の少なくとも約10%を表している。これらの大きな孔が全細孔容積の約10%未満の場合、その背圧が高くなり過ぎるであろう。好適には、これらの大きな孔は、全細孔容積の少なくとも約20%を表している、と言うのは、孔が大きければ大きい程そこを通る液体にかかる背圧が低くなるからである。これらの大きな孔は、全細孔容積の50%以上を表すこととできる。小さい孔の大きさは200nm未満、一般に約0.8から200nm、より好適には1から約100nmの範囲である。

この得られるプラグカラムはまた、液クロ装置が通常運転されている圧力、即ち約40MPa (6,000psi) に及ぶ圧力で、このプラグカラムを液クロにおける分離用媒体として利用できる程充分に堅いものである。このプラグカラムは、1種以上の有機溶媒と水を含んでいる液体組成物が、約30MPa (4,500psi) 未満の圧力で、厚さが150mmのプラグカラムを少なくとも約200cm/時の線形流量で通過することが可能な如き、均質の取れた適当なマクロ細孔度と物理的強度を有している。

これらのカラムを製造する方法は、一般に、(1) ボロゲンが入って

オグロビンおよびニワトリ卵アルブミンの勾配溶剤クロマトグラムである。

好適な態様の詳述

より詳細には、本発明のカラムは、好適には筒状であるが長方形または多角形であってもよい、本質的に硬質の管を含んでいる。この管は、金属、ガラスおよび硬質ポリマーを含む、クロマトグラフィーカラムの製造で用いられる通常の材料のいずれかから作られていてもよい。この管は限定された度合で柔軟性を示してもよいが、これは本質的に強く、その結果として、この重合反応を行っている間、その管の容積変化は本質的に生じない。この管を液クロ用カラムとして用いる場合、この管の各末端を、液クロに連結させるに適した継ぎ手で閉じる。本分野で知られている如何なる通常の継ぎ手も用いられ得る。

この管の中に、マクロ細孔有機ポリマーから成る少なくとも1種のプラグカラムを配置させる。カラム分離用媒体として動くプラグカラムに通すべきサンプルをこのプラグカラムに貫通させる必要があるように、このプラグカラムは、この管の内部断面領域を完全に横切って伸びている。このプラグカラムの厚さは約5mm以上であり、そのことからこれは膜から区別される。これの全体寸法は、勿論、このカラムの大きさに依存している。一般に、このプラグカラムの断面積は、数平方マイクロメートルから数平方メートルの範囲であり（利用できる管の大きさによってのみ制限される）、そしてその厚さ、即ち長さとは約5から200mm、もしくはそれ以上である。このマクロ細孔プラグカラムが占めている管の長さを伸ばす目的で、1つのプラグカラムか或は多数のプラグカラムを用いることができる。2個以上のプラグカラムを用いる場合、これら

いる脱気した重合可能混合物を、両端を閉じた硬質管の中に入れ、(2) この混合物を重合させることでマクロ細孔ポリマープラグカラムを生じさせ、そして(3) このプラグカラム（またはプラグカラム類）を溶媒で洗浄することにより、その製造したマクロ細孔ポリマー内に存在しているボロゲンを除去する、ことを含んでいる。

この重合混合物は、最小限、少なくとも1種のポリビニルモノマー、フリーラジカルを発生する開始剤、およびボロゲンを含んでいる。この混合物はまた、1種以上のモノビニルモノマー類および/または可溶ポリマー類または不溶マクロ細孔ポリマー粒子を含んでいてもよい。

適切なポリビニルモノマー類には、ジビニルベンゼン、ジビニルナフタレン、ジビニルピリジン、ジメタアクリル酸アルキレン類、ジメタアクリル酸ヒドロキシアルキレン類、ジアクリル酸ヒドロキシアルキレン類、ジメタアクリル酸オリゴエチレングリコール類、ジアクリル酸オリゴエチレングリコール類、ポリカルボン酸のビニルエステル類、ジビニルエーテル、ペンタエリスリトールのジエー、トリーまたはテトラメタアクリレートまたはアクリレート、トリメチロールプロパンのトリメタアクリレートまたはアクリレート、アルキレンビスアクリルアミド類またはメタアクリルアミド類、および上記適切なポリビニルモノマー類いずれかの混合物が含まれる。これらのアルキレン基は一般に約1-6個の炭素原子を含んでいる。

用いられ得るモノビニルモノマー類には、ステレン、環置換ステレン類（これらの置換基にはクロロメチルが含まれる）、18個の以下の炭素原子を有するアルキル、ヒドロキシル、ヒープチルオキシカルボニル、ハロゲン、ニトロ、アミノ基、保護されているヒドロキシルまたはアミ

ノ基、ビニルナフタレン、アクリレート類、メタアクリレート類、ビニルアセテート、ビニルピロリドンおよびそれらの混合物が含まれる。このポリビニルモノマーか、或はポリビニルモノマーとモノビニルモノマーは、一般に、この重合混合物の中に約10から60体積%の量、より好適には約20から40体積%の量で存在している。

使用するポロゲンは、種々の異なる種類の材料から選択され得る。例えば、適切な液状ポロゲン類には、脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、エステル類、アルコール類、ケトン類、エーテル類、可溶ポリマー類の溶液およびそれらの混合物が含まれる。このポロゲンは、一般に、この重合混合物の中に約40から90体積%の量、より好適には約60から80体積%の量で存在している。

これらのモノマー類と組み合わせ、可溶ポリマー類および不溶ポリマー粒子を用いることができる。これらのポリマー類は、重合に先立ってその重合混合物の中に添加される。これらの可溶ポリマー類は、ブラグカラムに溶媒を通すことによって、そのブラグカラムが生じた後のブラグカラムから溶出して来る。これらの可溶ポリマー類は、最終ブラグカラムの間隙率を増大させるポリマー状ポロゲンとして働く。ここで用いるに適切な可溶ポリマー類には、スチレンまたは環置換スチレン、アクリレート類、メタアクリレート類、ジェン類、塩化ビニルおよび酢酸ビニルの如きモノマー類の未架橋ポリマー類または共重合体が含まれる。重合中に体積が収縮するのを低くする目的で、不溶ポリマー粒子を用いる。この重合混合物内のモノマー類の体積が低ければ低い程、重合した時の体積収縮が小さくなる。ここで用いるに適した不溶ポリマー粒子には、同じモノマー類の架橋共重合体であるマクロ細孔ポリマー粒子が含

まれる。しかしながら、その重合混合物を生じさせる目的で用いたのと同じモノマー類から生じさせた不溶ポリマー粒子を用いるのが、適合性の点から現在のところ好適であり、これとそれらを組み合わせる。これらのポリマー粒子は、最初約1から1,000マイクロメートルの直径を有している。このポリマー粒子の混合物は同じ粒子サイズを有している必要はない。実際、不規則な大きさを有するポリマー粒子を用いる方が経済的であり、従って現在のところ好適である。必要ではないが、これらのポリマー粒子を、フリーラジカル重合を禁止する禁止剤が入っているもよい、重合混合物に混和性を示さない液体に浸漬してもよい。これは、孔の詰まりの原因となると共に有効にそれらをその分離過程から取り去るマクロ細孔粒子内部の重合を防止する目的で行うものである。このロッドは、その時、この分離過程に貢献し得ない無孔質ボールを含んでいる。適切な禁止剤には、塩化第二銅および亜硝酸ナトリウムが含まれる。この禁止剤は、全粒子重量を基準にして約0.001から1重量%の量、より好適には約0.1から1重量%の量で存在している。

好適には、この重合混合物で用いるに先立って、これらのポリマー粒子の脱気を行う。これは、本分野で知られている通常の手段のいずれかを用いて達成され得る。しかしながら、任意に重合禁止剤が入っている水の中にこれらの粒子を浸漬した後、約5から20分間の如き適切な期間、水流ポンプ真空下にこの水-ポリマー粒子混合物を維持することによって、その孔から空気を除去するのが現在のところ好適である。次に、過剰水を速過で除去してもよい。該可溶ポリマー類は、一般にこの重合混合物の約5から40体積%の量で存在しており、そして不溶ポリマー粒子は約5から50体積%の量で存在している。

重合を開始させる目的で、フリーラジカルを発生する通常の重合開始剤を用いることができる。適切な開始剤の例には、O-O-トリアミル-O-（2-エチルヘキシル）モノパーオキシカーボネート、ジプロピルパーオキシジカーボネートおよびベンゾイルパーオキシサイドの如きパーオキシサイド類、並びにアゾビスイソブチロニトリル、2,2'-アゾビス（2-アミジプロパン）ジヒドロクロライドおよび2,2'-アゾビス（イソブチルアミド）二水化物などが含まれる。ブラグカラム内の孔分布を調節する手段として開始剤の選択が用いられ得ることが見いだされた。特に、アゾビスイソブチロニトリルを用いて重合を実施する時、その大きな孔は全細孔容積の50%以上であるが、それをベンゾイルパーオキシサイドに置き換えると、その大きい孔の容積は全細孔容積の20%にまで低下した。この開始剤は、一般に、該モノマーの約0.2から5重量%の量でその重合混合物内に存在している。

この重合混合物をその管に入れるに先立って、この混合物の中に存在している酸素を除去するに充分な期間、窒素の如き不活性ガスをこの混合物の中にバブリングするなどの如き通常の手段で、この混合物の脱気を行う。この重合混合物を調整して脱気を行った後、これを、適切な継ぎ手で両末端を閉じた管の中に入れる。この重合混合物の全部を加えた後、重合させて単一ブラグカラムを生じさせる。別法として、この重合混合物を分割して加えてもよく、各添加後から次の添加を行うまで重合を行う。連続した添加で同じモノマー混合物を用いると、単一ブラグカラムが得られる。2種以上の異なる重合混合物を連続して用いると、この方法では、2種以上の異なるブラグカラムが生じる。現在のところ好適なものは単一ブラグカラムである、と言うのは、これは現在通常の充

填カラムによりよく適合しているからである。多数ブラグカラム技術を通常の装置に適用するのは困難であり、この技術は、1つの単一カラム内に異なる分離用媒体を特別に組み合わせることの利点を採用する新規なクロマトグラフィー様式と一緒に最良に用いられる。次に、重合を行う準備としてこの管を密封する。

この混合物をその管の中に入れた後、用いる開始剤とモノマー類に応じて、約6から24時間、一般に約50から90℃の温度の通常様式で重合を実施する。この重合は、好適には窒素またはアルゴンなどの不活性雰囲気内で実施される。本分野で知られている何らかの手段を用いて熱をかけることも可能であるが、この重合混合物が入っている密封した管を、加熱した浴の中に浸漬するのが現在のところ好適である。重合中に生じる収縮はその孔構造全体に影響を与えるが、この硬質管の壁との接触は維持される。

重合が完了した後、この固体状のマクロ細孔ポリマーブラグカラムを洗浄することで如何なるポロゲン溶媒も除去し、そして適切な溶媒を用いて、存在している如何なる可溶ポリマーも溶解させる。適切な洗浄溶媒には、メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン、アセトン、テトラヒドロフランおよびジオキサンが含まれる。この洗浄過程は段階的に行われてもよく、例えば、溶媒に続いて水で洗浄した後、再び溶媒で洗浄するか、或は溶媒を用いて連続洗浄することによって行われてもよい。この洗浄段階は、好適には、そのマクロ細孔ポリマーが詰まっている管を通してその溶媒をポンプ輸送することによって実施される。

特定の場合として、特にこのカラムの次の使用にとってこのマクロ細孔ポリマーに特定の官能基を加えるのが有利である場合、特定の官能基

を加えるに適切な材料でこのポリマーを処理することができる。例えば、このマクロ細孔ポリマーが重合させたメタアクリル酸グリシジルを含んでいる場合、このポリマーとジエチルアミンの如きアミンとを反応させるとN、N-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロピル (DEAHP) 基が生じ、或は塩酸トリエチルアミンと反応させると第四級トリメチルアミノ (Q) 基が生じ、また、このポリマーが有するエポキシ基の加水分解を最初に生じさせた後クロロ酢酸と反応させるとカルボキシメチル (CM) 基が生じ、或は亜硫酸-1, 4-ジオキサン複合体と反応させるとスルホン酸 (SP) 基が生じ得る。これらの基は、イオン交換クロマトグラフィー使用蛋白質分離に必須である。アルコラート類、例えばカリウムブチラート、オクチラートおよびヘキサデシラートなどと反応させることにより、このマクロ細孔ポリマーに疎水基を与えることができる。この組の基は、疎水相互作用における分離および逆相模式に必須である。また、このポリマーを、単一化合物または小さい群の化合物に特異的な親和剤 (affinants) と反応させて、これをアフィニティークロマトグラフィーで用いることができる。適切な親和剤は抗体、抗原、染料、糖類、レクチン類、蛋白質および核酸である。同様な様式で、また、他のモノマー類を基とするポリマー類を修飾して、全ての様式のクロマトグラフィーで用いることができる。その後、このブラグカラムを適切な溶媒で段階的にか或は1段階操作で洗浄してもよい。

この洗浄段階に關連した更に別の代替方法は、その重合したブラグカラムをその管から取り出し、適切な溶媒でそれを洗浄した後、これをその管に戻すことを伴っている。この戻したポリマーをそのままにしておくか、或はテトラヒドロフラン、1, 4-ジオキサン、トルエンまたは

ハロゲン化炭化水素の如き膨潤用溶媒でそのポリマーを洗浄してその膨潤を生じさせることにより、その管の中のより広い空間を占めさせるようにすることができる。

この洗浄段階の後、そのマクロ細孔ポリマーが入っている管は使用準備が出来ている。これは、本分野で知られている通常の技術に従い、連続クロマトグラフィーカラムとして用いられると共に、触媒、診断または吸収方法の目的で用いられ得る。例えば、このクロマトグラフィーカラムを用いてサンプルをその成分に分離させる場合、このサンプルのための担体として水または緩衝液を用いることができる。このサンプルが入っている溶液をポンプ輸送することにより、それを、その管の中に入っているブラグカラムに通す。溶媒剤の特性、例えばpH、イオン強度、有機溶媒含有量などを変化させることにより、分離を進行させる。この組成の勾配は、線形、段階様または対数の如き如何なる形態であってもよい。次に、その分離されたサンプルの検出は、本分野で知られている手段を用い、染色技術を用いてそのカラムそれ自身の中か、或はこのカラムからその成分が個々に溶離して来る時、このブラグカラムの下流またはこの管の外側で達成され得る。本発明に従うマクロ細孔ポリマー分離用媒体は、約100から100万の範囲の分子量を有する材料の分離に有効性を示す。充填カラムを用いて行われ得る如何なる分離も本発明のカラムを用いて実施され得る。

以下に示す非制限的実施例を参照して本発明をここに記述するが、全ての部およびパーセントは、特に明記されていない限り重量である。

実施例 I

液クロに取り付けるに適した継ぎ手が両末端に備わっているステンレ

ス鋼製管 (内部直径が4.6mmであり、長さが50mm) の1つの末端を、鋼製ナットストッパーで閉じ、この管を窒素バージした後、そのもう一方の末端を、シリコンゴム隔壁で閉じた。4.8gのメタアクリル酸グリシジル、3.2gのジメタアクリル酸エチレン、10.8gのシクロヘキサノール、1.2gのドデカノール、および0.08gのアゾビスイソブチロニトリルを混合することによって、重合混合物を調製した。この混合物に窒素を20分間バブリングすることによって、存在している如何なる酸素も除去した。この混合物の0.1mLを、その隔壁を通してその管の中に注入した後、熱電対で70℃にしたオイルバスの中で加熱することにより、重合を開始させた。7時間後、その管をその浴から取り出し、放置して室温にまで冷却した後、その隔壁を取り外した。この時点で、このカラムは、長さが5mmの固体状マクロ細孔ポリマーブラグカラムを含んでいた。このポリマーをメタノールで洗浄した後、この管の両末端をクロマトグラフィー用ナットで閉じ、そしてこのカラムをHPLCクロマトグラフに取り付けた。最初に、メタノールを異なる流量でそのカラムにポンプ輸送した。その背圧は、0.5mL/分の流量の時0.4MPaであり、流量が1mL/分の時0.8MPaであり、そして2mL/分の時1.6MPaであった。次に、この溶媒をテトラヒドロフランに変えた後の背圧は、0.2mL/分の時0.2MPaであり、そして2mL/分の時1.9MPaであった。この流量に対する背圧の依存性は線形であることが見いだされた。

これらの測定の後、このカラムの底を開けて、溶媒圧を用いてその多孔質ポリマーロッドを取り出した。

実施例 II

該重合ストック溶液を0.15mL用いる以外は実施例 I と同様な操作を用いた。この管から取り出した後のブラグカラムの長さは9mmであった。

このブラグカラムを50mLの丸底フラスコの中に入れた後、ジエチルアミンを5mL加えた。この内容物を3時間還流させた。その重合させたメタアクリル酸グリシジル単位のエポキシ基がそのアミンと反応することでN、N-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロピル基 (DEAHP) が生じ、これらの基は、イオン交換クロマトグラフィー使用蛋白質分離にとって必須である。この反応が終了した後、このロッドをメタノール、水、再びメタノールで洗浄した後、乾燥させる。このDEAHP基含有量は1.59ミリモル/gであることが確認された。

この乾燥させたブラグカラムをそのカラム管に戻し、水の中に2時間浸漬し、その末端を継ぎ手で閉じた後、1つの末端をHPLCクロマトグラフのポンプに連結する一方、もう1つを検出器に連結しないままにしておいた。このような構造配置でその背圧を測定した。流量が1mL/分の時の背圧は0.5MPaであり、3mL/分の時のそれは1.3MPaであり、そして5mL/分の時のそれは2.2MPaであった。UV検出器に連結した後の背圧は、0.5mL/分の流量の時0.4MPaにまで上昇した。

このカラムを、そのベースラインのずれが生じなくなるまで (20分間)、0.02モル/Lのトリス-HCl緩衝液 (pH=7.3) (緩衝液A) を0.5mL/分の流量で用い、クロマトグラフィー条件下で洗浄した。0.21gのチトクロームC、リゾチーム、ミオグロビンおよびオボアルブミンが入っている溶液を、ループを通して注入した後、

上記ポリマーの連続床が吸収するままにした。このカラムを通した上記緩衝溶液のポンプ輸送を20分間行った後でも、漏れの兆候は全く見られなかった。その吸収は全体的であった。次に、勾配溶離を開始した。この溶離剤を緩衝液Aから緩衝液B（緩衝液Aの中に1モル/Lの塩化ナトリウム）に、10分以内に直線的に変化させた。この予備試験で用いたクロマトグラフィー条件は理想的な条件から程遠いが、4種の蛋白質全ての分離が観察された。これらの蛋白質の保持時間は7.4、7.7、7.9および8.1分であった。

実施例 I I I

実施例 I で用いたのと同じ管の中に、3 mL のステレン、1.2 mL のジビニルベンゼン（85%のDVB）、6 mL のベンジルアルコールおよび0.05 g のベンゾイルパーオキサイドから成るストック混合物を0.3 mL 注入した。脱気した後、この管を閉じ、そして重合を70℃で24時間進行させた。鋼製プランジャーを用い、長さが18 mm の多孔質ポリマープラグカラムをその管から押し出した後、メタノールをいくつかに分け、その中で4日間洗浄した。この洗浄後でもこのプラグカラムは元の管に合致していた。この溶媒をテトラヒドロフランに変え、これはそのプラグカラムの膨潤を生じさせた。約20分後、このプラグカラムの直径は、その管の直径以上になった。次の溶媒交換でメタノールを用いて、このプラグカラムを元の大きさにまで収縮させた。その後、このプラグカラムをそのカラムに戻し、そして再びメタノールをテトラヒドロフランに交換した。このカラム内における膨潤を背圧の変化として監視し、この背圧は、この管の残りの部分がまだメタノールで満たされている時の0.3 MPa から始まって、この溶媒のいくらか

が交換された後の10 MPa 以上にまで上昇した。その時点で、この装置に関する何らかの可能な損傷が生じるのを防止する目的で、この測定を終了した。

実施例 I V

窒素を10分間バブリングすることによって、実施例 I に記述したモノマー類の混合物を脱気した。マクロ細孔ポリ[メタアクリル酸グリンジル-コ-ジメタアクリル酸エチレン]ビードを蒸留水に浸漬した後、この水-ポリマー混合物を水流ポンプ真空下に10分間置くことによって、それらが有する孔から空気を除去した。次に、これらのビードを濾過して過剰水を除去した。次に、これらのビードの約1 mL を、連続的に窒素バージしている丸底ガラスビンの中に仕込み、上記脱気した重合混合物を0.5 mL 加え、この分散液をガラス棒で攪拌した後、このビンを密封した。その重合を70℃で6時間進行させた。この重合が終了した後、このビンの内容物は均一であるように見えた。そのメタアクリル酸グリンジルが有するエポキシ基とそのガラス表面が有するシラノール基とが反応することから、このビンの損傷を生じさせることなくこのビンからそのブロックを取り出すのは不可能であった。そのようにしても、そのブロック表面からそのガラスを剥離させるのは非常に大変であった。このブロックは、小さい片に割れる傾向を示さないか、或はその元のビードとそれに連結している共重合体とのフラグメントは分離する傾向を示さなかった。

実施例 V

ステンレス鋼製カラム（内部直径が8 mm であり、長さが50 mm ）の1つの末端を密封し、アルゴンでバージ洗浄した後、そのもう一方の

末端をシリコンゴム隔壁で閉じた。36 mL のメタアクリル酸グリンジル、24 mL のジメタアクリル酸エチレン、72 mL のシクロヘキサノール、18 mL のドデカノール、および0.6 g のアゾビスイソブチロニトリルを混合することによって、重合混合物を調製した。この混合物を水流ポンプ減圧下で15分間音波処理した後、更に15分間窒素をバブリングすることによって、溶解している気体を除去した。このカラムの管を、上記重合混合物で完全に満たした後、この管を密封した。この重合を70℃の水浴内で8時間進行させた。この重合が完了した後、このカラムをその浴から取り出し、そして周囲温度にまで冷却させた。長さが50 mm であるそのロッドを洗浄する目的で、このカラムの両末端に在るストッパーをクロマトグラフィー用継ぎ手に交換した後、このカラムをHPLCクロマトグラフに取り付けた。最初に、メタノールを異なる流量でそのカラムにポンプ輸送することでこのロッドの洗浄を行うと同時に、このカラムを通る流れを試験した。この背圧は、0.5 mL/分の流量の時0.8 MPa であり、1 mL/分の時1.9 MPa であり、2 mL/分の時4 MPa であり、そして5 mL/分の時13 MPa であった。この背圧は、この洗浄操作全体を通して変化しなかった。このカラムを通してポンプ輸送したメタノールの全量は200 mL であった。

このカラムをそのクロマトグラフから取り外した後、このカラムの入り口に1 mL のジエチルアミンを注入した。このカラムの入り口と出口を、デルリン（delrin）プラグカラムで閉じた後、このカラムを、熱電対で60℃にした水浴の中に3時間入れた。次に、このカラムをHPLCクロマトグラフに取り付けた後、その未反応のアミンをメタノールで

洗浄除去した。この改質過程中、このプラグカラムは膨潤し、そしてこの膨潤したポリマーが部分的にその孔を占める。これは、この洗浄過程を開始した時の背圧が高いことで説明される。この背圧は、流量が2 mL/分の時3.2 MPa であり、そして1 mL/分の時1.5 MPa であった。メタノールを用いて50分間洗浄した後、水-メタノールの1:1混合物を用いた。この背圧は、0.5 mL/分の流量の時2.0 MPa にまで上昇した。更に1時間後、このメタノール-水混合物を蒸留水に交換した。この背圧は、流量が0.5 mL/分の時の6.6 MPa、そして1 mL/分の時の12.7 MPa にまで低下した。最後に、このカラムを0.02モル/Lのトリス-HCl緩衝液（pH=7.6）（緩衝液A）で洗浄した。流量が0.5 mL/分の時の背圧は5.7 MPa であった。

ニワトリ卵アルブミン（8 mg/mL）、ニワトリ卵白蛋白質（16 mg/mL）およびモデル蛋白質混合物（16 mg/mL）が入っている溶液（2 L）を、ループを通して注入した後、緩衝液Aの流れの中で、その連続マクロ細孔ポリマープラグカラムの上に10分間吸着させるままにした。緩衝液B（緩衝液Aの中に1モル/LのNaCl）の濃度勾配を用い、0.5 mL/分の流量で上記蛋白質の溶離を行った。図1-3に示す個々のクロマトグラムは、それぞれアルブミン（図1）、卵白蛋白質（図2）およびモデル蛋白質（図3）に関するものである。218 nm の波長でこれらの検出を行った。勾配クロマトグラフィーは通常の如く、用いた溶媒組成物の勾配から、図1-3のベースラインは平らでない。これらの図内の実線はクロマトグラムであり、そして溶媒組成の変化を示す目的で、点線を加えた。

実施例 V I

直径が8 mmであり長さが50 mmのステンレス鋼製管の1つの末端をシリコンゴム隔壁で閉じ、そしてもう1つの末端を固体状シリコンゴムプラグカラムで閉じた。3 mLのステレン、2 mLのジビニルベンゼン、7.5 mLのドデカノールおよび0.5 gのアゾビスイソブチロニトリルを混合することによって、重合混合物を調製した。窒素を15分間バージすることによって、この混合物の脱気を行った。この混合物を、その隔壁を通してその鋼製管の中に注入した後、熱電対で70℃にした空気浴内でその管を加熱することにより、重合を開始させた。20時間後、この管をその熱浴から取り出し、そして周囲温度にまでゆっくりと冷却した。このカラムの両末端にあるストッパーを取り外して、標準的なクロマトグラフィーカラム継ぎ手に取り換えた。このカラムをクロマトグラフに取り付けた後、メタノールを用い、0.1 mL/分の流量で1時間、そして1 mL/分の流量で30分間洗浄した。この2番目の洗浄操作中の背圧は一定して0.2 MPaであった。

このカラムの出口を開け、そして20 mL/分の流量でメタノールを用い、このカラムからその重合したロッドを押し出した。このロッドを室温で乾燥し、粉碎して小さい片にした後、水相ポロシメトリー (porosimetry) を用いて、このポリマーの孔サイズ分布を評価した。試験を2回繰り返した分布曲線を図4に示す。

実施例 V I I

メタノールを用いた洗浄操作が完了した後、このカラムの出口継ぎ手をUV検出器に連結する以外は、実施例 V I の操作に従ってカラムを調製した。このカラムを、アセトニトリル-水の1:1の混合物を用い、

1 mL/分の流量で2時間平衡にした。次に、この平衡を連続した数段階で25 mL/分の流量にまで上昇させ、そしてその背圧を記録した。その結果を図5に示すが、ここでは、その流量に対する背圧の線形依存が明らかである。この結果は、クロマトグラフィーで用いるに妥当な背圧、即ち約40 MPa (6,000 psi) 以下の範囲のまま、非常に高い流量でこの連続ロッドカラムが有効であることを立証している。

チトクロームC、ミオグロビンおよびニワトリ卵アルブミンが入っている溶液をこのカラムに注入した後、勾配溶離クロマトグラフィーを開始させた。水中20%のアセトニトリルから水中60%のアセトニトリルへの線形勾配を用いた。このアセトニトリル濃度をその開始濃度から最終混合物に変化させる時間 (勾配時間) は、5 mL/分の流量で4分、10 mL/分で2分、15 mL/分で1.3分、そして25 mL/分で0.8分であった。このクロマトグラムを図6に示す。

比較実施例 A

そのステンレス鋼製管を軟質のポリ (テトラフルオロエチレン) 管に置き換える以外は実施例1の操作を繰り返す。そのポリマープラグカラムが備わっているその得られる管を通常のクロマトグラフに連結した場合、40 MPa (6,000 psi) の如き高い圧力でも、このプラグカラムを通るテトラヒドロフランの流れは本質的に全く観察されなかった。実施例6と同様に、この管を切り離してそのプラグカラムを取り出すことによってこのプラグカラムの孔サイズ分布を評価した時、約200 nm以上の孔は全く見いだされなかった。

請求の範囲

1. 分離用媒体が入っている管である高性能液体クロマトグラフィーに適切なカラムにおいて、上記管が硬質管であり、そして該分離用媒体が、該硬質管内に配置されておりそしてこの硬質管の断面領域全体を横切って伸びているマクロ細孔有機ポリマーのワンピース連続プラグカラムであり、ここで、上記プラグカラムの厚さは少なくとも5 mmであり、そして上記プラグカラムは、200 nm未満の直径を有する小さい孔と、600 nm以上の直径を有する大きな孔の両方を有しており、ここで、上記大きな孔が、このプラグカラムの全細孔容積の少なくとも10%を与えており、そしてここで、上記プラグカラムをポロゲン存在下の重合反応で製造することを特徴とするカラム。

2. 上記カラムがそこを通して有機溶媒と水から選択される液体を少なくとも約200 cm/時の線形流量および約30 MPa (4,500 psi) 未満の圧力で通過させることを特徴とする請求の範囲1のカラム。

3. 該マクロ細孔ポリマープラグカラムが約30から90%の間隙率を有していることを特徴とする請求の範囲1および2のカラム。

4. 該管がマクロ細孔ポリマーの2種以上の異なるプラグカラムを含んでいることを特徴とする請求の範囲1-3のカラム。

5. 該マクロ細孔ポリマーがポリビニルモノマーのポリマーを含んでいることを特徴とする請求の範囲1-4のカラム。

6. 該マクロ細孔ポリマーがポリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの共重合体を含んでいることを特徴とする請求の範囲1-5のカラム。

7. (i) 両末端を閉じた硬質金属管に、少なくとも10体積%のポリビニルモノマー、少なくとも40体積%のポロゲンおよび0.2から5重量%の開始剤を含んでいる脱気した重合混合物を加え、(ii) この混合物を該管内で重合させることによりマクロ細孔有機ポリマープラグカラムを生じさせ、そして(iii) このポリマープラグカラムを洗浄することでそのポロゲンを除去する段階によって特徴づけられる、請求の範囲1-6のカラムを製造する方法。

8. 該重合混合物を少なくとも2つの部分として加え、これらの部分の各々に関して、次の部分を添加するに先立って重合を実施することを特徴とする請求の範囲7の方法。

9. 少なくとも2種の異なる重合混合物を連続的に加え、これらの混合物の各々に関して、次の混合物を添加するに先立って重合を実施することを特徴とする請求の範囲7の方法。

10. 該洗浄を、該プラグカラムを該管の中に置きながら実施することを特徴とする請求の範囲7の方法。

11. 洗浄に先立って該管から該プラグカラムを取り出した後、管に戻すことを特徴とする請求の範囲7の方法。

12. 該プラグカラムを該管に戻した後、このプラグカラムを膨潤させることを特徴とする請求の範囲11の方法。

13. 該重合混合物が更にモノビニルモノマーを含んでいることを特徴とする請求の範囲7の方法。

14. 該ポロゲンが液体または可溶ポリマー類から成る群から選択されることを特徴とする請求の範囲7および13の方法。

15. 該重合混合物が、重合中の体積縮小を低くするための不溶ポ

リマー粒子を含んでいることを特徴とする請求の範囲7の方法。

16. 該ポリマー粒子を、該重合混合物と組み合わせるに先立って、この重合混合物に混和性を示さない液体に浸漬することを特徴とする請求の範囲7-15の方法。

17. 該不溶ポリマー粒子がマクロ細孔性を示し、そしてこれらを、該重合混合物と同じモノマーから生じさせることを特徴とする請求の範囲15の方法。

18. 請求の範囲1から6のカラムを用いることを含む、液体クロマトグラフィーによる化合物の分離方法。

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classifications (parent, supply, indicate all) According to International Patent Classification (IPC) or to both International Classification and IPC)		
Int. Cl. 5 B01D15/08; G01N30/48		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Symbol		
Characterization System	Classification Symbol	
Int. Cl. 5	B01D ; G01N	
Documentation Symbol other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are referred to in the Fields Searched		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹		
Category ²	Citation of Document, if with indication, where appropriate, of its relevant passages ³	Relevant to Claim No. ⁴
Y	US, A, 5 019 270 (AFETAN) 28 May 1991 see column 7, line 46 - column 8, line 18 see column 16, line 1 - line 47	1 19, 20, 22, 23
A	GB, A, 1 188 736 (CESKOSLOVENSKA AKADEMIE) 22 April 1970 see page 1, line 35 - page 3, line 5	1 6, 12
Y	US, A, 3 580 843 (SALVER) 25 May 1971 see column 5, line 16 - line 40	1, 6, 12, 14, 16-19
A	US, A, 3 878 092 (FULLER) 15 April 1975 see column 12 - column 14; claims 1-17	1, 4, 5, 6, 9, 12, 14, 16-19
	-/-	
¹ Special categories of cited documents: ^{1a} "A" documents defining the present state of the art which is not considered to be of practical relevance; ^{1b} "L" documents which may have priority claims or which are cited as pertinent prior art or as being of interest for other reasons (for example); ^{1c} documents referred to in oral disclosures, etc., citations of other works; ^{1d} documents published prior to the international filing date but later than the priority date disclosed.		
² "Y" later documents published after the international filing date or priority date and not to be searched with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention; ^{2a} documents of particular relevance; the cited documents should be considered as relevant or as being of interest; ^{2b} documents of particular relevance; the cited documents should be considered as relevant or as being of interest; ^{2c} documents of particular relevance; the cited documents should be considered as relevant or as being of interest; ^{2d} documents of particular relevance; the cited documents should be considered as relevant or as being of interest.		
IV. CITATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of the International Search Report
05 FEBRUARY 1993		17.02.93
International Searching Authority		Signature of Authorial Office
EUROPEAN PATENT OFFICE		WENOLING J.P.

From PCT/US 92/09100 (transmitted 11 January 1993)

International Application No. PCT/US 92/09100		
RE DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category ²	Citation of Document, with indication, where appropriate, of its relevant passages ³	Relevant to Claim No. ⁴
A	US, A, 3 541 007 (VAN VENROOY) 17 November 1970 see column 4; example 3	1, 3

From PCT/US 92/09100 (transmitted 11 January 1993)

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are not cited in the European Patent Office EPO file as they are not relevant for the purposes of information. 05/02/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-5019270	28-05-91	AU-A- 2203692	05-11-92
		AU-B- 630427	29-10-92
		AU-A- 5151390	06-02-91
		CA-A- 2018393	06-01-91
		EP-A- 0442977	28-08-91
		JP-T- 4500726	06-02-92
		WO-A- 9100762	24-01-91
GB-A-1188736	22-04-70	None	
US-A-3580843	25-05-71	None	
US-A-3878092	15-04-75	None	
US-A-3541007	17-11-70	DE-A- 2020520	23-12-70
		GB-A- 1283812	02-08-72

From PCT/US 92/09100

For more details about this annex: see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/93

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成12年3月14日(2000. 3. 14)

【公表番号】特表平7-501140

【公表日】平成7年2月2日(1995. 2. 2)

【年通号数】

【出願番号】特願平5-507935

【国際特許分類第7版】

G01N 30/48

B01D 15/08

G01N 30/48

【F I】

G01N 30/48 G

B01D 15/08

G01N 30/48 M

手続補正書

平成11年9月30日

特許庁長官 近 藤 隆 殿

1. 事件の表示

平成5年特許願第507935号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 コーネル・リサーチ・フアウンデーション・インコーポレーテッド

3. 代理人

〒107-0052

住所 東京都港区赤坂1丁目9番15号

日本目研会館

氏名(6078)弁理士 小田島 平 吉

電話 3585-2256



4. 補正命令の日付 なし

5. 補正の対象

1994年1月13日付提出の補正書(平成6年4月15日付提出の補正書の写し提出書)の明細書の「特許請求の範囲」の欄及び「発明の詳細な説明」の欄

6. 補正の内容

1) 特許請求の範囲を別紙の如く訂正する。

2) 明細書25頁、最下行「全く見いだされなかった。」の次に次文を挿入する。

「本発明の実施の態様を示すと次のとおりである。

1. 分離用媒体が入っている管である高性能液体クロマトグラフィーに適切なカラムにおいて、上記管が硬質管であり、そして該分離用媒体が、該硬質管内に配置されておりそしてこの硬質管の断面領域全体を横切って伸びているマクロ細孔有機ポリマーのワンピース連続プラグカラムであり、ここで、上記プラグカラムの厚さは少なくとも5mmであり、そして上記プラグカラムは、200nm未満の直径を有する小さい孔と、600nm以上の直径を有する大きな孔の両方を有しており、ここで、上記大きな孔が、このプラグカラムの全細孔容積の少なくとも10%を与えており、そしてここで、上記プラグカラムをボロゲン存在下の重合反応で製造することを特徴とするカラム。

2. 上記カラムがそこを通して有機溶媒と水から選択される液体を少なくとも約200cm/時の線形流速および約30MPa(4,500psi)未満の圧力で通過させることを特徴とする上記1のカラム。

3. 該マクロ細孔ポリマープラグカラムが約30から90%の空隙率を有していることを特徴とする上記1および2のカラム。

4. 該管がマクロ細孔ポリマーの2種以上の異なるプラグカラムを含んでいることを特徴とする上記1-3のカラム。

5. 該マクロ細孔ポリマーがポリビニルモノマーのポリマーを含んでいることを特徴とする上記1-4のカラム。



6. 該マクロ細孔ポリマーがポリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの共重合体を含んでいることを特徴とする上記1-5のカラム。

7. (1) 両末端を閉じた硬質金属管に、少なくとも10体積%のポリビニルモノマー、少なくとも40体積%のポロゲンおよび0.2から5重量%の開始剤を含んでいる脱気した重合混合物を加え、(ii) この混合物を該管内で重合させることによりマクロ細孔有機ポリマーブラグカラムを生じさせ、そして(iii) このポリマーブラグカラムを洗浄することでそのポロゲンを除去する段階によって特徴づけられる、上記1-6のカラムを製造する方法。

8. 該重合混合物を少なくとも2つの部分として加え、これらの部分の各々に関して、次の部分を添加するに先立って重合を実施することを特徴とする上記7の方法。

9. 少なくとも2種の異なる重合混合物を連続的に加え、これらの混合物の各々に関して、次の混合物を添加するに先立って重合を実施することを特徴とする上記7の方法。

10. 該洗浄を、該ブラグカラムを該管の中に置きながら実施することを特徴とする上記7の方法。

11. 洗浄に先立って該管から該ブラグカラムを取り出した後、管に戻すことを特徴とする上記7の方法。

12. 該ブラグカラムを該管に戻した後、このブラグカラムを膨潤させることを特徴とする上記11の方法。

13. 該重合混合物が更にモノビニルモノマーを含んでいることを特徴とする上記7の方法。

14. 該ポロゲンが液体または可溶ポリマー類から成る群から選択

されることを特徴とする上記7および13の方法。

15. 該重合混合物が、重合中の体積縮小を低くするための不溶ポリマー粒子を含んでいることを特徴とする上記7の方法。

16. 該ポリマー粒子を、該重合混合物と組み合わせるに先立って、この重合混合物に混和性を示さない液体に浸漬することを特徴とする上記7-15の方法。

17. 該不溶ポリマー粒子がマクロ細孔性を示し、そしてこれらを、該重合混合物と同じモノマーから生じさせることを特徴とする上記15の方法。

18. 上記1から6のカラムを用いることを含む、液体クロマトグラフィーによる化合物の分離方法。」

(別紙)

請求の範囲

1. 分離用媒体が入っている管である高性能液体クロマトグラフィーに適切なカラムにおいて、上記管が硬質管であり、そして成分分離媒体が、該硬質管内に配置されておりそしてこの硬質管の断面領域全体を横切って伸びているマクロ細孔有機ポリマーのワンピース連続ブラグカラムであり、ここで、上記ブラグカラムの厚さは少なくとも5mmであり、そして上記ブラグカラムは、200nm未満の直径を有する小さい孔と、800nm以上の直径を有する大きな孔の両方を有しており、ここで、上記大きな孔が、このブラグカラムの全細孔容積の少なくとも10%を与えており、そしてここで、上記ブラグカラムをポロゲン存在下の重合反応で製造することを特徴とするカラム。

2. (1) 両末端を閉じた硬質金属管に、少なくとも10体積%のポリビニルモノマー、少なくとも40体積%のポロゲンおよび0.2から5重量%の開始剤を含んでいる脱気した重合混合物を加え、(ii) この混合物を該管内で重合させることによりマクロ細孔有機ポリマーブラグカラムを生じさせ、そして(iii) このポリマーブラグカラムを洗浄することでそのポロゲンを除去する段階によって特徴づけられる、請求の範囲1記載のカラムを製造する方法。